

Resumen

Recientes trabajos del laboratorio BIBITE estudiaron la posibilidad de preparar cementos macroporosos, así como la utilización de cementos de fosfato de calcio (CPC) como sistemas de liberación de antibióticos. En este proyecto se evaluó por primera vez la posibilidad de introducir macroporosidad en los CPCs como una vía para modular la liberación de principios activos.

La introducción del principio activo seleccionado, Hiclato de doxiciclina (Doxy-h), en los cementos espumados alteró notablemente parámetros de importancia en los cementos como los tiempos de fraguado, lo que llevó a un importante trabajo de optimización del proceso de espumado ya existente.

Se optimizaron también los dispositivos para el proceso de liberación de cementos espumados conteniendo DOXY-h, teniendo en cuenta parámetros como la dificultad para desmoldar, la fragilidad de las espumas o la porosidad de la superficie. Por tanto se diseñaron moldes de teflón individuales que permiten introducir los cementos espumados en los vasos de liberación y utilizarlos como dispositivo de liberación.

Para permitir la comparación, se mantuvieron constantes distintos parámetros de los CPCs, como la relación líquido/polvo (RLP), el tipo de polvo (α -TCP) así como el hecho de añadir el antibiótico en la fase polvo. Se prepararon por tanto cementos densos en presencia o ausencia de Tween 80, así como cementos espumados de acuerdo con los parámetros optimizados. Para cada tipo de cemento se preparó igualmente su homólogo con DOXY-h. Se observó un aumento significativo de la superficie específica (SSA) de cementos con DOXY-h, respecto a los clásicos. Los cementos espumados tienen una SSA inferior a la de los densos. Ello se explica en vistas a las micrografías de microscopía electrónica de barrido (FESEM), que mostraron cambios en la microestructura de los cementos según las diferentes composiciones. Se destaca la posible interacción entre el Tween 80 y la DOXY-h que parece impedir la cristalización en determinados casos.

Los ensayos de liberación se hicieron con cementos espumados, así como con dos tipos de cementos densos, uno con H_2O_{mQ} como fase líquida y el otro con H_2O_{mQ} conteniendo 1% en peso de Tween 80, para comprobar el efecto de este tensioactivo igualmente presente en los cementos espumados y se observó que la introducción de macroporosidad en los cementos permite incrementar el % de principio activo liberado, lo cual abre una vía muy interesante para trabajos futuros.





Sumario

Resumen	1
Glosario	5
1. Introducción	7
1.1. Hueso	7
1.1.1. Introducción.....	7
1.1.2. Función de los huesos	7
1.1.3. Anatomía de los huesos.....	8
1.1.4. Células en el hueso.....	10
1.2. Sustitución de hueso	11
1.2.1. Necesidad médica.....	11
1.2.2. Química de los CPC.....	12
1.2.3. Miembros de la familia de ortofosfatos de calcio	15
1.2.4. Ventajas de los CPC	16
1.2.5. Inconvenientes de los CPC	17
1.3. Porosidad	18
1.3.1. Introducción.....	18
1.3.2. Importancia de la porosidad en ingeniería de tejido óseo.....	20
1.3.3. Espumas	22
1.3.3.1. Mecanismos	22
1.3.3.2. Tensiometría.....	23
1.3.3.3. Tensioactivos.....	24
1.4. Utilización de CPC con antibiótico	27
1.4.1. Generalidades sobre antibióticos.....	27
1.4.2. Hiclato de doxiciclina.....	30
2. Materiales y métodos	32
2.1. Antibiótico.....	32
2.2. Fases para la preparación de los cementos	32
2.2.1. Fase líquida.....	32
2.2.2. Fase sólida.....	33
2.3. Obtención de α -TCP	33
2.4. Preparación del polvo a utilizar	34
2.5. Preparación de cementos	35
2.5.1. Cementos densos	35
2.5.2. Cementos espumados	35



2.5.3.	Protocolo durante el fraguado	36
2.5.4.	Liberación de antibiótico	36
3.	Técnicas	39
3.1.	DRX (Difracción de rayos X)	39
3.2.	Microscopio óptico.....	40
3.3.	BET	40
3.4.	FESEM (Microscopía electrónica de barrido con cañón de emisión de campo).....	42
3.5.	MIP (Mercury Intrusion Porosimetry).....	42
4.	Resultados.....	44
4.1.	DRX (Difracción de rayos X)	44
4.2.	Optimización del proceso de formación de espumas con antibiótico para los ensayos de liberación	44
4.2.1.	CPC espumados sin antibiótico	45
4.2.2.	Incorporación de DOXY-h a CPC espumados.....	45
4.2.3.	Optimización de los moldes/recipientes para el fraguado de las espumas con DOXY-h 50	
4.2.4.	Evaluación del comportamiento de las espumas en condiciones de ensayos de liberación	53
4.3.	Tensión superficial de las fases líquidas.....	54
4.4.	Superficie específica	55
4.5.	Microscopia electrónica.....	57
4.6.	Porosimetría	62
4.7.	Ensayos de liberación	65
4.7.1.	Ensayo de optimización	65
4.7.2.	Influencia de los componentes y del espumado sobre la liberación	67
4.7.3.	Influencia de la cantidad de antibiótico en cementos espumados sobre la liberación	69
5.	Impacto ambiental y costes del proyecto	71
5.1.	Costes	71
5.2.	Impacto ambiental	71
6.	Conclusiones	73
7.	Trabajos futuros.....	75
	Agradecimientos	76
	Bibliografía.....	77



Glosario

α -TCP Fosfato tricálcico α , α -Ca₃(PO₄)₂

β -TCP Fosfato tricálcico β , β -Ca₃(PO₄)₂

Método de la balanza de Wilhelmy Técnica que permite medir la tensión superficial de un líquido

BET Técnica de medida de la superficie específica por adsorción de N₂. El nombre proviene de sus inventores: Brunauer, Emmett y Teller

Bioactividad Capacidad de formar un enlace directo con el hueso, sin interposición de una capsula fibrosa

Biocompatibilidad Capacidad de un material de cumplir su función dando lugar a una respuesta adecuada del organismo receptor en una situación específica

CaP Calcium Phosphate

CDHA Hidroxiapatita deficiente en calcio, obtenida por precipitación de un fosfato de calcio en una solución acuosa bajo condiciones fisiológicas, con fórmula Ca₉(HPO₄)(PO₄)₅(OH)

Cemento Conglomerados hidráulicos que mezclados con agua fraguan y endurecen, tanto expuestos al aire como sumergidos en agua

CMC Concentración Micelar Crítica. Concentración mínima para que un tensioactivo forme agregados llamados “micelas”

CPC Cemento de fosfato de calcio

DRX Difracción de rayos X. Es una técnica de caracterización de fases cristalinas

DOXY-h Hiclate de doxiciclina. Antibiótico de fórmula química (C₂₂H₂₄N₂O₈·HCl)₂·C₂H₆O·H₂O

Endurecimiento Consolidación, aumento de la dureza y de la resistencia mecánica hasta obtener una consistencia sólida

FDA Food and Drug Administration

FESEM Microscopía electrónica de barrido con cañón de emisión de campo. Más conocido por su nombre en inglés, Field Emission Scanning Electron Microscopy

Fraguado Es cuando la pasta de un cemento pierde su plasticidad de manera que si se manipula se daña la estructura de manera irreversible o si se mezcla con más agua no se recupera la plasticidad, o se recupera solo parcialmente

Espuma Dispersión relativamente estable de un gas en un líquido



Espumante Agente capaz de estabilizar una espuma, especialmente las películas entre burbujas

HA Hidroxiapatita sinterizada a alta temperatura, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Hidrófilo Textualmente “amigo del agua”. Se dice de una sustancia o de un grupo funcional que posee una afinidad predominante para el agua

Hidrófobo Textualmente “enemigo del agua”. Se dice de una sustancia o de un grupo funcional que posee una afinidad predominante para las sustancias no polares

Hueso cortical Tejido exterior y más duro de los huesos (compacto)

Hueso trabecular Tejido de consistencia esponjosa presente en la parte interna de los huesos

L/P Relación líquido/Polvo (volumen de fase líquida dividido por la masa de polvo)

MIP Mercury Intrusion Porosimetry

Osteoblastos Células óseas formadores del tejido óseo

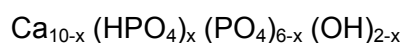
Osteocitos Osteoblastos maduros que ya no forman hueso

Osteoclastos Células óseas que reabsorban el hueso

Osteoconductividad Un material osteoconductivo es un material que sirve de trama para la formación ósea originada en el tejido óseo adyacente.

PBS (*Phosphate Buffered Solution*). Solución tampón (amortiguadora del pH) de un fosfato salino

PHA Hidroxiapatita precipitada, obtenida por precipitación de un fosfato de calcio en una solución acuosa a temperatura ambiente o corporal, con formula



Porosidad Porcentaje en volumen de espacios vacíos respecto al volumen total de la muestra

Reabsorción Degradación química y absorción controlada del biomaterial, que es reemplazado por tejido del huésped

Regeneración Sustitución progresiva del biomaterial por tejido nuevo (= Bioactividad + reabsorción)

Tensioactivo Sustancia capaz, al adsorberse en la superficie o interfase, de afectar (reducir) la tensión superficial

Tween 80 Nombre comercial del polisorbato 80, un detergente no iónico y emulsionante derivado del sorbitol, utilizado en la industria alimenticia y farmacéutica. Sirve para estabilizar o "disolver" las grasas o aceites en soluciones acuosas



1. Introducción

1.1. Hueso

1.1.1. Introducción

El hueso es el único tejido conectivo duro que existe y su componente principal es la hidroxiapatita, que es inorgánica y tiene como formula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Se considera como un material compuesto.

En la figura 1 se muestran los diferentes tejidos humanos.

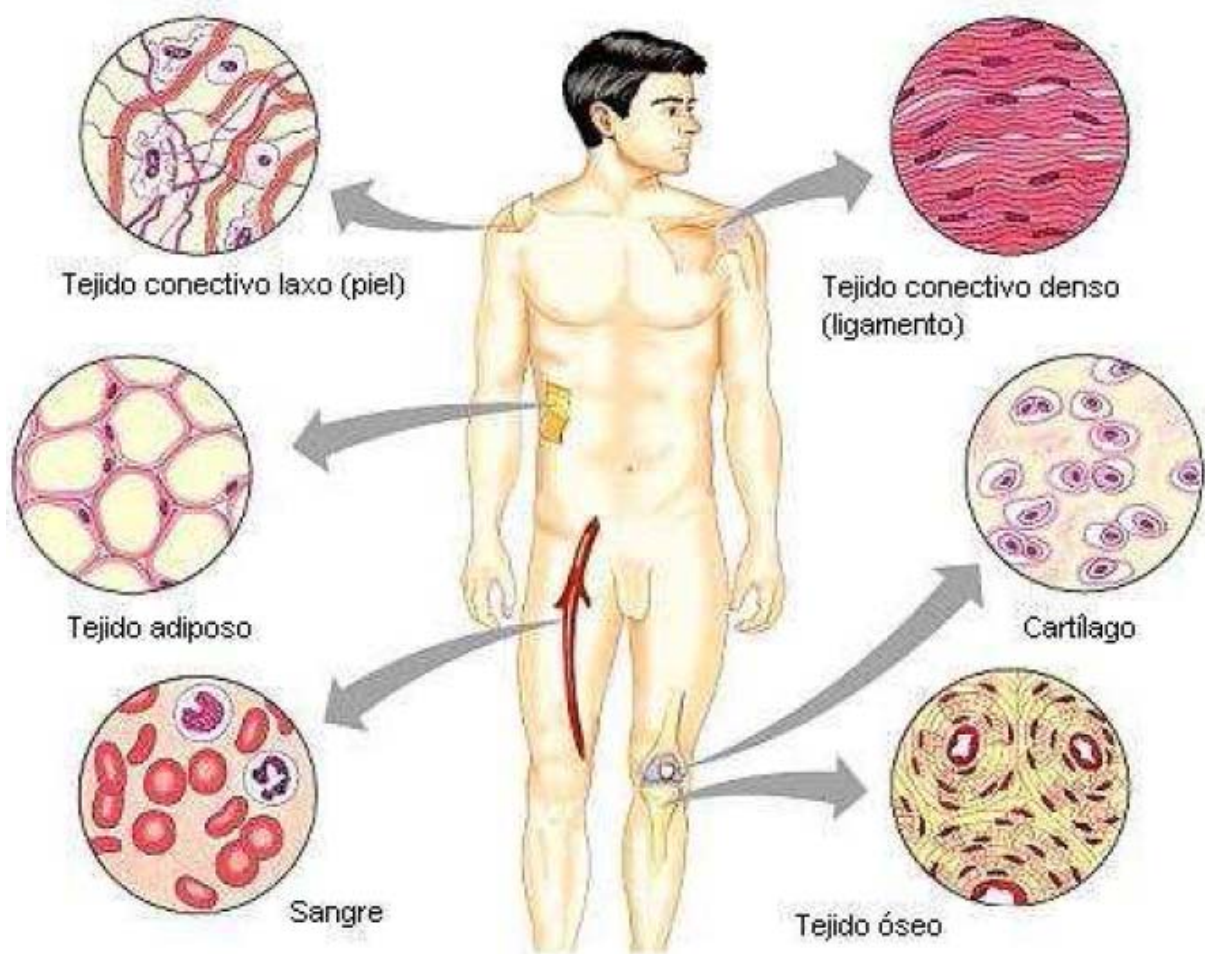


Figura 1 : Tipos de tejidos en el cuerpo humano [1]

1.1.2. Función de los huesos

- Movilidad: Permiten el movimiento de los vertebrados gracias a los enlaces entre tejido óseo y músculos [1]



- Estabilidad: Permiten estabilizar los tejidos blandos [2]
- Protección: La protección cráneo, columna, tórax y pelvis permite proteger órganos vitales
- Hematopoyesis: Producen células sanguíneas
- Homeostasis mineral: Regulan el metabolismo de ciertos iones (Ca, Na, H, Mg, P)

1.1.3. Anatomía de los huesos

El esqueleto de un embrión humano se conforma por 350 huesos cartilaginosos. Conforme el individuo crece, la mayoría de estos huesos se fusionan para alcanzar la madurez del esqueleto alrededor de los 25 años de edad, cuando el esqueleto adulto consta de 206 huesos [2]. El esqueleto humano adulto está compuesto por el 80 % en peso de hueso cortical o compacto, y el 20 % restante corresponde a hueso trabecular o esponjoso (ver figura 2).

El hueso cortical se encuentra principalmente en las paredes interna y externa de las diáfisis de los huesos largos y en la capa externa del resto de los huesos. Este tipo de hueso contiene tan sólo el 10 % de porosidad, contiene pocas células y algunos vasos sanguíneos que irrigan la estructura a través de una red de cavidades denominados canales de Havers. La estructura básica del hueso cortical es la osteona, la cual posee una estructura cilíndrica compuesta de capas concéntricas de tejido óseo llamadas lamelas. Las osteonas se alinean longitudinalmente en los huesos largos y en el centro de cada una de ellas se localizan los canales de Havers (ver figura 2) [3].

El hueso trabecular se localiza en el interior de las costillas, las vertebras y en los extremos de los huesos largos cerca de las articulaciones. Este tipo de hueso consiste en una red interconectada de tejido óseo llamada trabécula. La red trabecular está orientada preferentemente en el sentido de soporte de esfuerzos y posee una porosidad entre 50 y 90%. Los poros contienen vasos sanguíneos y médula ósea, por lo que su resistencia es menor que la del hueso cortical. La resistencia y el módulo de elasticidad del hueso trabecular varían en función de su densidad [3,4].



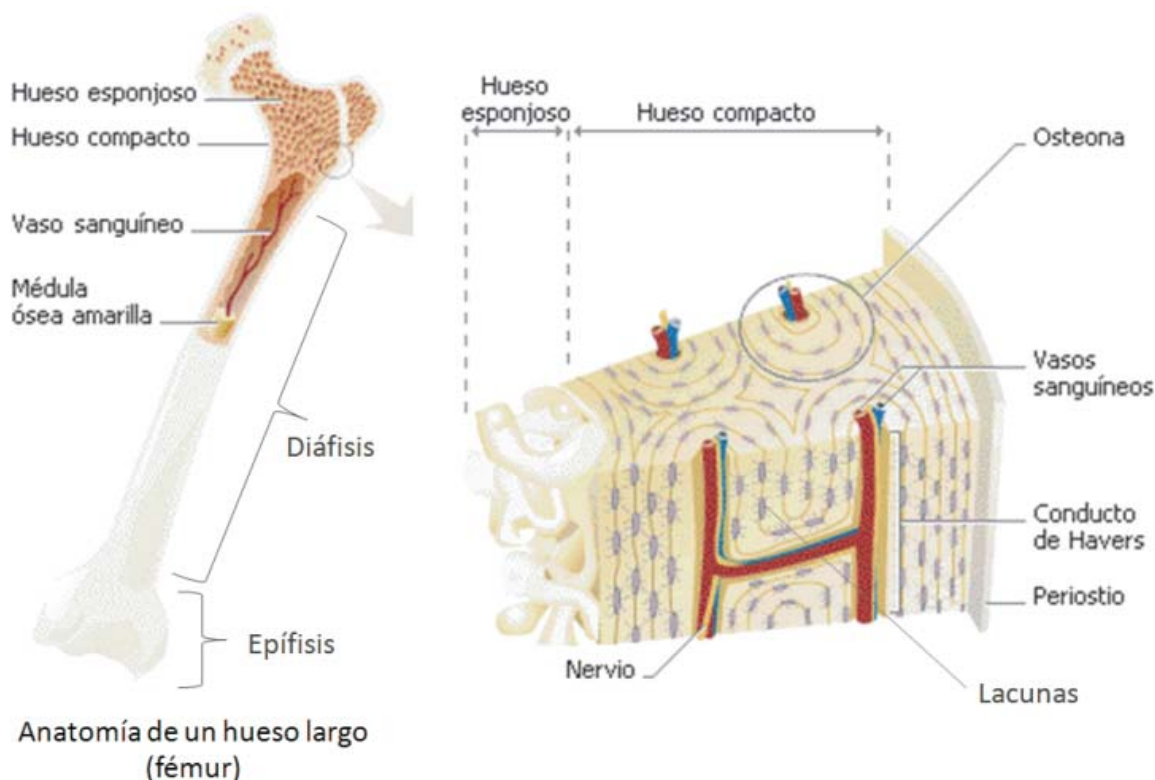


Figura 2: Anatomía del hueso cortical y esponjoso

El hueso está formado por 30% de fase orgánica (principalmente colágeno) y por 70% de fase mineral (principalmente hidroxiapatita), cada una compuestas por otras cosas desarrolladas en la figura 3.

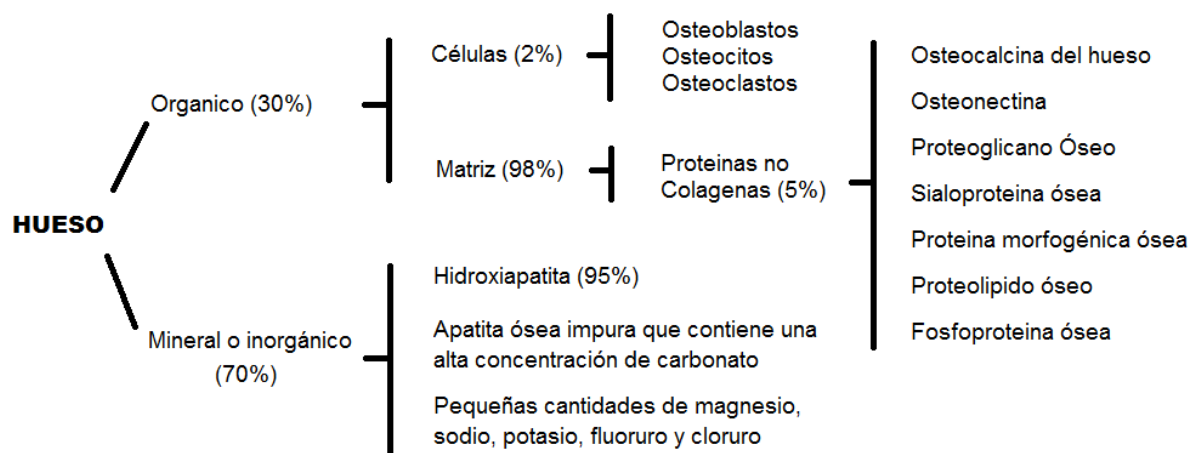


Figura 3: Composición del hueso [5]



1.1.4. Células en el hueso

El tejido óseo se conforma por 4 tipos de células visibles en la figura 4: los osteoblastos, los osteoclastos, las células de recubrimiento, que se localizan sobre la superficie del tejido, y los osteocitos que se localizan al interior de la estructura mineralizada [6].

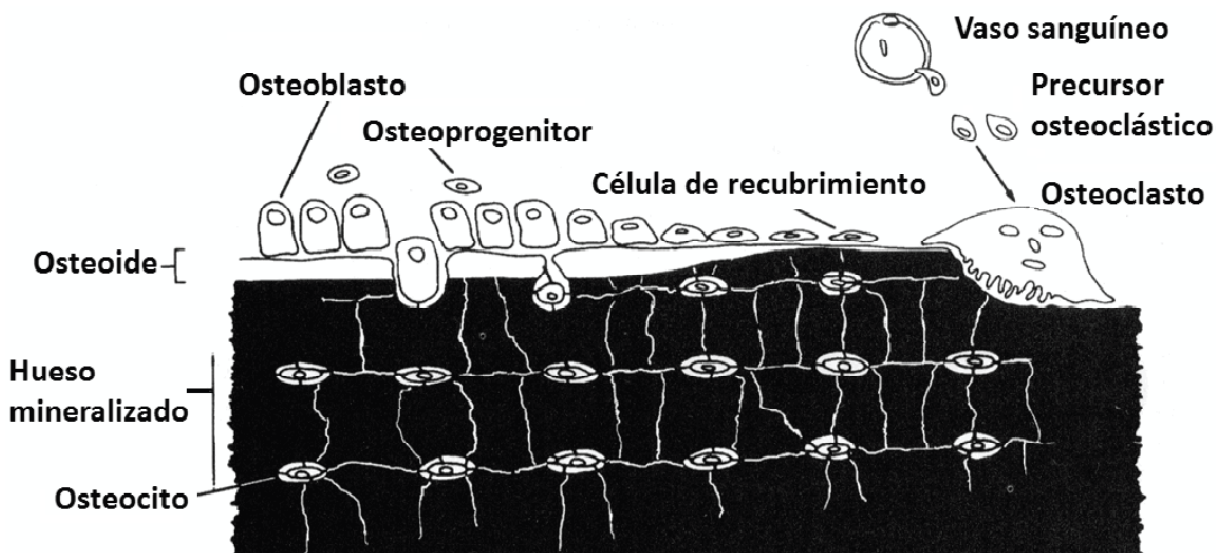


Figura 4: Distribución de las células óseas [6]

Aunque sólo hay un 2% de células en el hueso, tienen un papel muy importante en la elaboración y en la reconstrucción del hueso.

Hay dos tipos mayores de células: las células encargadas de formar hueso (osteoblastos y osteocitos) y las células que lo reabsorben (osteoclastos) [7].

Osteoblastos: se puede decir, resumiendo, que es la célula que produce el hueso. Se encarga de sintetizar y organizar el colágeno y proteínas no colágenicas, así como mineraliza los osteoides. Una vez que el osteoblasto está atrapado en el osteoide que ha fabricado previamente y mineralizado, se convierte en osteocito.

Osteocitos: El osteocito es la célula que se encuentra dentro del hueso calcificado. Sus prolongaciones citoplasmáticas están conectadas con las de otros osteocitos a través de una red de canales muy finos que se encuentran en la sustancia intercelular, llamada canalículos. A través de estos canales se producen intercambio de informaciones entre osteocitos, así como intercambios entre ellos y las células de la superficie ósea (osteoblastos y osteoclastos en mayoría).

Osteoclastos: Son células que reabsorben el hueso. Se caracterizan por sus dimensiones elevadas (10-100µm de diámetro) y sus núcleos numerosos (entre 3 y 10). Para resorber el



hueso, se fija a la superficie ósea, creando un espacio subosteoclasto aislado en el cual el pH disminuye localmente. Este fenómeno permite la disolución del componente mineral de la matriz y la creación del entorno necesario para que una serie de enzimas degrade el colágeno. El nombre de este fenómeno es “laguna de Howship”[7].

Células osteoprogenitoras u osteogénicas: Proviene de la mesenquima. Tienen forma de huso. Muestran retículo endoplasmático rugoso escaso, así como, aparato de Golgi poco desarrollado pero se encuentran ribosomas libres en abundancia. En el adulto, se encuentran en la capa celular interna del periostio y del endostio. Su diferenciación depende de las condiciones del medio:

- Si la presión parcial de oxígeno es alta, se diferenciarán en osteoblastos
- Si la presión parcial de oxígeno es baja, se desarrollarán células condrogénicas

1.2. Sustitución de hueso

1.2.1. Necesidad médica

El progreso de la medicina y el aumento de la esperanza de vida han provocado nuevas necesidades en los medios ortopédicos y dentales. Se pueden destacar unas enfermedades que aparecen con la vejez:

Osteoporosis: Es la pérdida local o sistémica de hueso, debida a una velocidad de reabsorción ósea superior a la de formación, que puede ocurrir sobre los 40 años. Conduce a la fragilidad de los huesos que por eso se podrán romper más fácilmente. Osteoporosis se observa mucho en las mujeres después del climaterio, para quien faltan estrógenos [4].

Enfermedad de Paget: Se produce por culpa de un incremento en la actividad osteoclástica, o sea un aumento de la formación de hueso fibrilar por los osteoblastos durante la etapa de reversión. Este tipo de hueso, más frágil que el hueso laminar remodelado, también aumenta la posibilidad de fractura de los huesos. [4]

Enfermedades articulares: Las enfermedades reumáticas son lesiones sistémicas que afectan el cartílago articular. Son una enfermedad crónica de origen inmunológico que genera la inmovilidad de las articulaciones por el dolor, y pueden provocar la fusión de los huesos de la articulación. Por el contrario, la artritis o la degradación articular, es una alteración local relacionada directamente con la actividad cotidiana. La elevada actividad de una articulación, ya sea por el exceso de carga o por tratarse de una persona de edad



avanzada, da como resultado la degradación del cartílago, que genera la fricción de los huesos en la articulación. El dolor producido por la fricción impide el movimiento de la articulación y puede culminar con la fusión del par articular [4].

Enfermedades bucodentales: La formación de placa dentobacteriana puede llevar a una inflamación periodontal que destruye los componentes celulares y estructurales del tejido periodontal, lo que favorece el aflojamiento y la pérdida de las piezas dentales [4]. Existen diferentes enfermedades bucodentales cuyas ciertas están desarrolladas en la parte 1.4.2.

A finales de los años 1960 la necesidad de una mejor biocompatibilidad de las prótesis resultó en un concepto nuevo que podría imitar el tejido natural del hueso [8,9]. La Hidroxiapatita (HA) es una cerámica que se puede encontrar en la naturaleza, y también es la parte más grande de la fase mineral del hueso. Por ello, la HA es compatible con el cuerpo. Se ha mostrado que la HA es bioactiva, ya que es capaz de tener un enlace directo con el hueso, sin la formación de una capsula fibrosa. Esta bioactividad da la posibilidad de llevar al crecimiento del hueso sobre su propia superficie: se llama la osteoconductividad [10]. El problema de la HA clásica, obtenida por sinterización, es que es estequiométrica y poco resorbible. Cuando lo que se busca es la regeneración ósea, es necesario disponer de un material reabsorbible, por ejemplo los cementos de fosfatos de calcio (CPC).

1.2.2. Química de los CPC

Generalmente los CPC están constituidos por uno o más fosfatos de calcio y una fase líquida (generalmente agua). El término fosfatos de calcio hace alusión a una de las familias de ortofosfatos, pirofosfatos o dipolifosfatos y polifosfatos de calcio. En el caso de los CPC se trata de los ortofosfatos, que constituyen la fracción inorgánica de la mayoría de los tejidos duros del cuerpo humano, como huesos y dientes. Son sales del ácido fosfórico a diferentes niveles de disociación: H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} y/o PO_4^{3-} [4,10,11].

Cuando se mezclan los fosfatos de calcio con la fase líquida, se forma una pasta capaz de fraguar y endurecer una vez en el cuerpo a temperatura ambiente. El cemento puede fraguar siguiendo un proceso de disolución y precipitación, explicado en detalle en la figura 5. La disolución de los reactivos forma un microentorno saturado, muy lejos del equilibrio [12,13].



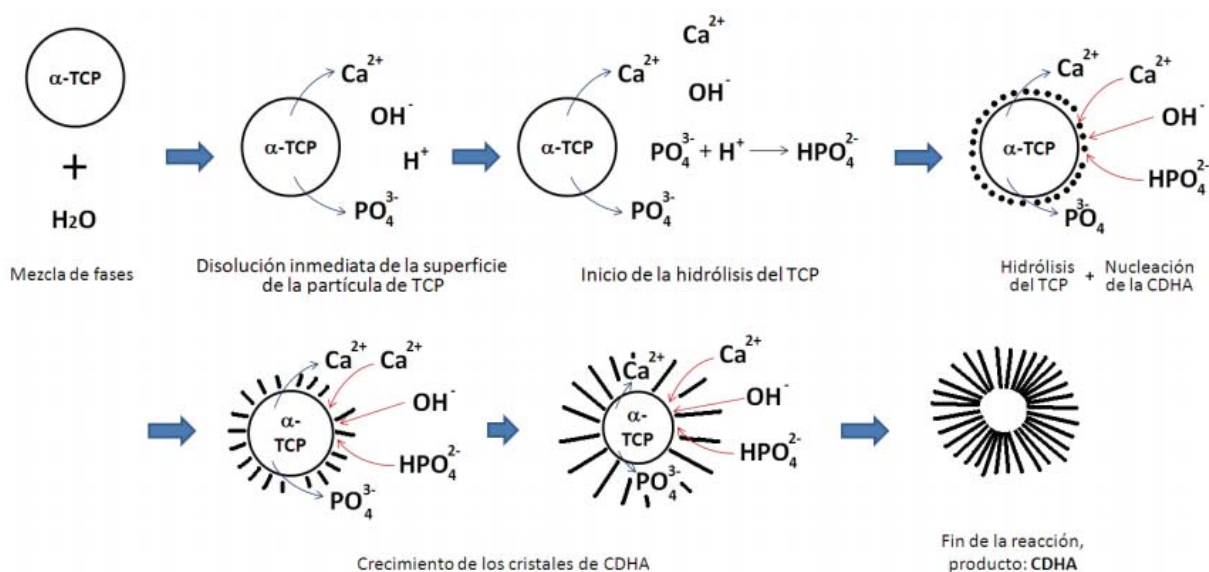


Figura 5: Esquema que muestra con detalle las etapas y procesos que ocurren durante la reacción de fraguado y/o endurecimiento de un cemento en base a α -TCP. Las tres etapas posteriores al mezclado toman desde pocos segundos hasta varios minutos, mientras que el final de la reacción puede tomar desde horas hasta días [4].

Este proceso se puede resumir gracias a la figura 6. Las etapas de fraguado y endurecimiento tienen diferentes tiempos especiales que es importantes conocer para la implantación en el cuerpo (figura 7).

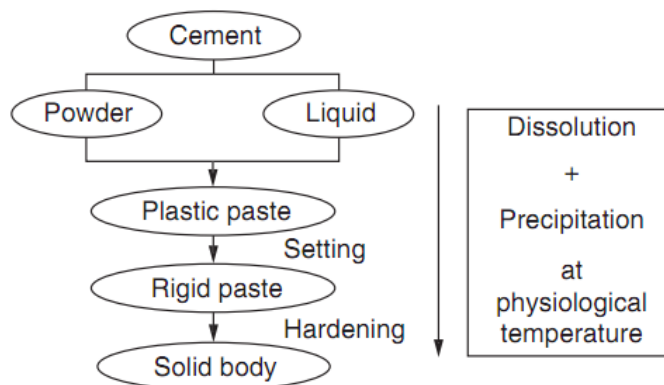


Figura 6: Esquema de la formación de un cemento de fosfato de calcio [10]



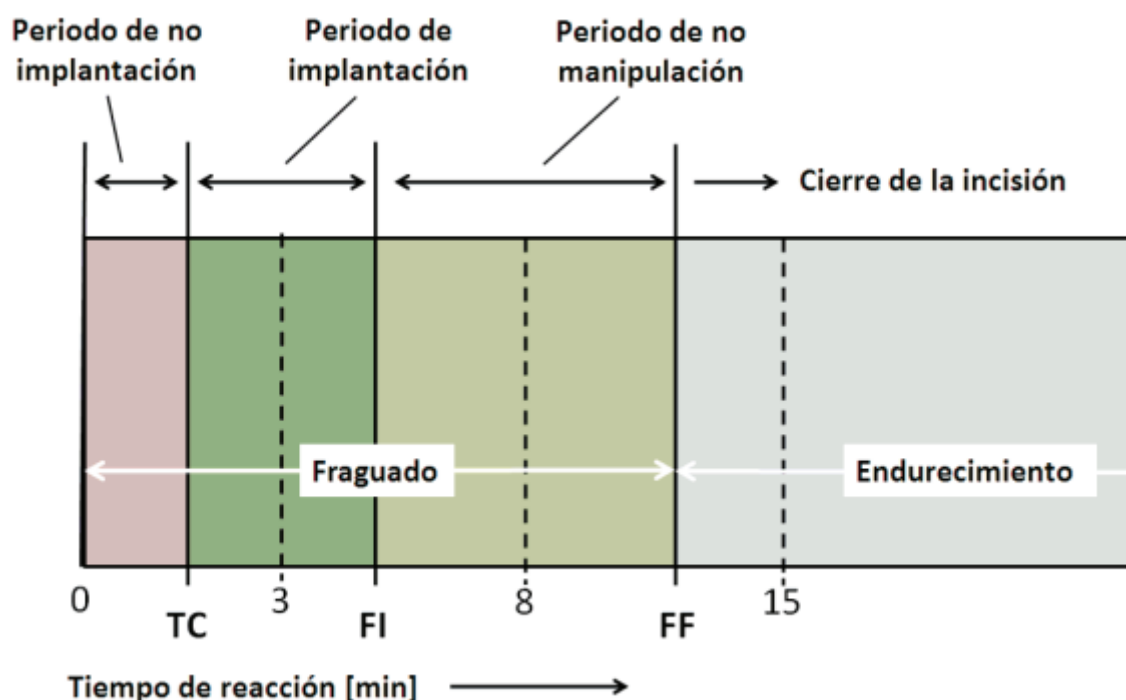


Figura 7: Diagrama de los parámetros importantes de fraguado y endurecimiento de un CPC: Tiempo de cohesión TC, tiempo de fraguado inicial FI, tiempo de fraguado final FF [4,14,15]

El tiempo de cohesión TC es el tiempo necesario para que el cemento no se desintegre en una solución Ringer [16] o en otra solución, en función del método de trabajo. Los tiempos inicial y final de fraguado se miden con agujas de Gillmore: se examina visualmente la superficie de muestras de cementos para ver si se puede ver una marca después de la indentación o sea si el cemento ha fraguado o no. Se utiliza una aguja gruesa para medir el tiempo inicial de fraguado FI, y una aguja más fina y más pesada para medir el tiempo final de fraguado FF [16]. Para las aplicaciones dentales el tiempo de fraguado debe ser aproximadamente de 3 minutos mientras que se sitúa en 8 minutos para aplicaciones ortopédicas. En cualquier caso, si el tiempo F alcanza 15 minutos, no se podrá utilizar el cemento [14,16]. El endurecimiento es debido al entrelazado de los cristales precipitados. La velocidad de fraguado puede aumentar mucho con la adición de un acelerante.

Aunque hay muchas posibilidades de formulaciones, existen hoy en día solo dos productos finales diferentes: Brushita ($\text{DCPD: CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) estable a $\text{pH} < 4,2$ y hidroxiapatita precipitada (PHA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) estable a $\text{pH} > 4,2$, que vamos a desarrollar más en detalle. Los cementos apatíficos que existen tienen una composición no estequiométrica, y en inglés se llaman “calcium-deficient hydroxyapatite” (CDHA: $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ con $(1 < x < 0)$). Se pueden producir a temperatura ambiente, a diferencia de la HA estequiométrica que se produce a alta temperatura. Además, la hidroxiapatita no

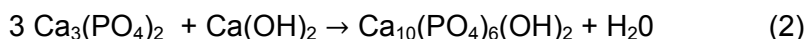


estequiométrica es mucho más parecida al hueso. Efectivamente la formación de hidroxiapatita a través de una reacción de cementación es un proceso biomimético.

Los CPC que conducen a la formación de HA o CDHA se pueden clasificar en tres grupos [10], hechos a partir del número y el tipo de los fosfatos de calcio utilizados para hacer la mezcla de polvo. Estos tres grupos son:

- los CPC hechos con un mono componente, en lo cual un único componente de fosfato de calcio hidroliza para formar HA o CDHA
- los CPC formados por dos fosfatos de calcio, uno ácido y el otro básico, que fraguan siguiendo una reacción ácido-base
- los sistemas formados por más de dos componentes, incluido fosfatos de calcio y otras sales, por ejemplo calcio, carbonato de estroncio o fosfato de magnesio

Para producir HA utilizamos Difosfato de Calcio (DCP) y Carbonato de Calcio. Se produce Trifosfato de Calcio (TCP) que reacciona con Hidróxido de Calcio y forma hidroxiapatita, como se puede ver en las ecuaciones (1) y (2).



Para obtener CDHA, se tiene que cambiar la relación Ca/P. La relación para HA estequiométrica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es de 1,67, entonces si lo disminuimos obtendremos CDHA. Por ejemplo, con una relación de 1,50, obtenemos $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$.

1.2.3. Miembros de la familia de ortofosfatos de calcio

Se conocen 11 tipos diferentes de fosfatos de calcio con una relación Ca/P entre 0,5 y 2,0. Esta relación, así como la relación basicidad/acidez y la solubilidad son los parámetros más importantes para caracterizarlos. Cuanto más la relación Ca/P esté, menos el fosfato de calcio será ácido y soluble en agua [17].

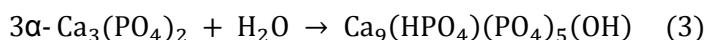
Vamos a desarrollar dos tipos en detalle, el α -TCP que serán utilizados para los estudios desarrollados en este informe, y el β -TCP que está directamente relacionado.

El β -TCP (β -fosfato de tricalcio, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; cuyo nombre químico correcto es fosfato de calcio tribásico beta) no puede ser precipitado a partir de soluciones acuosas. Es una fase formada a alta temperatura, que solo se puede formar a una temperatura superior a 800°C. Se hace gracias a la descomposición térmica de CDHA o a la interacción de fosfatos ácidos



de calcio tal como DCPA con una base tal como CaO. A temperaturas más elevadas que 1125°C, el β -TCP se transforma en α -TCP (α -fosfato de tricalcio, β -Ca₃(PO₄)₂). La fase estable a temperatura ambiente es el β -TCP, entonces es menos soluble en agua. Para guardarlo a temperatura ambiente, se debe hacer un “quenching” para que el α -TCP no tenga el tiempo de cambiar de fase durante el enfriamiento [17].

La reacción de fraguado del α -TCP se lleva a cabo por la hidrólisis de un componente en base a α -TCP, en un proceso que involucra de forma paralela reacciones de disolución y precipitación, resultando como producto de la reacción de fraguado la CDHA con una proporción Ca/P de 1.5 [4,18-21], de acuerdo a la ecuación (3).



El mecanismo de fraguado del cemento se esquematiza con detalle en la figura 5. En una primera etapa, la disolución de las partículas de α -TCP en la fase líquida del cemento generan la saturación local de iones alrededor de las partículas de reactivo, que como consecuencia origina la precipitación de la fase más estable sobre la partícula, en este caso la apatita. La precipitación es la segunda etapa durante el fraguado, e involucra una reacción química con el grupo hidroxilo del agua, por lo que la fase líquida no es solo un método de generar una pasta, sino que interviene directamente en la reacción de fraguado de acuerdo a la ecuación global (3).

Inicialmente el mecanismo de reacción está controlado por la cinética de hidrólisis del α -TCP y la precipitación de la CDHA. Conforme la reacción avanza, se forma una capa de CDHA sobre la partícula de α -TCP. Cuando esta capa es lo suficientemente gruesa, el mecanismo controlante de reacción cambia a la difusión de iones a través de la capa de producto [4,18-21]. Por tanto, el proceso de disolución y precipitación está controlado por mecanismos de transporte como la difusión de los iones en la pasta del cemento o factores termodinámicos como la saturación local de iones, por lo que la proporción L/P de mezclado, el medio de fraguado y diferentes componentes tanto en la fase líquida como en la sólida, pueden modificar la cinética de la reacción, originando diferentes morfologías de los cristales precipitados y por tanto diferentes propiedades del material [4].

1.2.4. Ventajas de los CPC

Se pueden destacar diferentes propiedades en los CPCs:

- Biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad, reabsorbible : permite una alta regeneración ósea
- Posibilidad de fraguado in vivo



- Inyectabilidad, que puede permitir procedimientos quirúrgicos menos invasivos y menos agresivos que los clásicos
- Adaptación al lugar del implante, lo que permite una buena superficie de contacto entre el hueso y el material, cual que sea la geometría. El contacto entre el tejido y el biomaterial favorece el crecimiento del hueso
- De los puntos de vista químico y físico, los productos son parecidos a la HA biológica, gracias a la reacción de fraguado a temperatura ambiente con un proceso de disolución-precipitación. Eso permite una mejor reactividad de los CPC en comparación con cerámicas de fosfato de calcio
- Posibilidad de incorporación de medicamentos. Antibióticos y anti-inflamatorios pueden sobrevivir y estimular una reacción biológica, debido al hecho que la reacción de fraguado ocurre a temperatura ambiente. En este informe se desarrollarán resultados de ensayos sobre este tema.

1.2.5. Inconvenientes de los CPC

Sin embargo, los CPC también tienen inconvenientes. Los más importantes son sus malas propiedades mecánicas y solubilidad. También son frágiles como la mayoría de las cerámicas. Además, como son materiales porosos, su resistencia mecánica en general es más baja que los de cementos acrílicos. Por lo tanto no se pueden utilizar para aplicaciones con grandes cargas por lo que su uso está limitado al tratamiento de defectos maxilofaciales o para aplicaciones con cargas mayores, pero con la ayuda de implantes metálicos [10].

En efecto, la resistencia del hueso trabecular es cercana 10MPa, por lo que, para utilizar CPC en aplicaciones ortopédicas, deberían que tener una resistencia de como mínimo este valor [22]. Los huesos están sometidos a fuerzas de torsión, tensión, compresión y de doblado. Desgraciadamente los CPCs solo son suficientemente resistentes en compresión [23]. En teoría después de fraguar pueden alcanzar propiedades comparables a las de los bloques compactos de fosfatos de calcio con la misma porosidad. Sin embargo en experimentos la resistencia de los cementos es más baja que la de los huesos, de los dientes o de los biocerámicas de fosfato de calcio [24].

Además, se necesita un cierto tiempo para que los CPC alcancen sus propiedades mecánicas finales, lo que obliga la inmovilización del paciente hasta que el proceso de endurecimiento haya acabado. Se tiene que esperar un tiempo mayor al tiempo final de fraguado (figura 7).



1.3. Porosidad

1.3.1. Introducción

La porosidad es un factor clave para permitir la penetración celular y el crecimiento de hueso nuevo [25]. La porosidad de un material se define como la fracción o el porcentaje de espacios vacíos respecto al volumen total del mismo [26,27]. Los poros en un material se caracterizan por parámetros como:

- La geometría del poro: esféricos, cilíndricos, planos, etc.
- El tamaño del poro: microporoso (<2nm), mesoporoso (2-50nm) o macroporoso (>50nm)
- La continuidad o nivel de conexión entre poros: porosidad abierta o porosidad cerrada
- La geometría de las conexiones: fisuras, conductos, cuellos de botella, etc. [4]

Al contrario de las estructuras porosas metálicas y poliméricas, los poros en componentes cerámicos han sido evitados en el pasado ya que confieran fragilidad al material. Sin embargo, el número de aplicaciones con cerámicas porosas ha aumentado mucho en estas últimas décadas. Cambios en porosidad abierta y cerrada, distribución de tamaño de los poros así que la morfología de los poros tienen un efecto muy importante en las propiedades de los materiales. Estos parámetros microestructurales se ven muy influidos por la manera de producir los materiales porosos.

Existen muchos métodos de formación de cerámicas porosas, siendo el más conocido la sinterización parcial de un polvo inicialmente poroso o la sinterización de una mezcla de polvos que permite la formación de poros en estado sólido. También existen otras posibilidades para producir cerámicas porosas con un control de la microestructura, que han sido desarrollados para responder a las nuevas aplicaciones potenciales [28]. La figura 8 muestra tres de estas posibilidades.



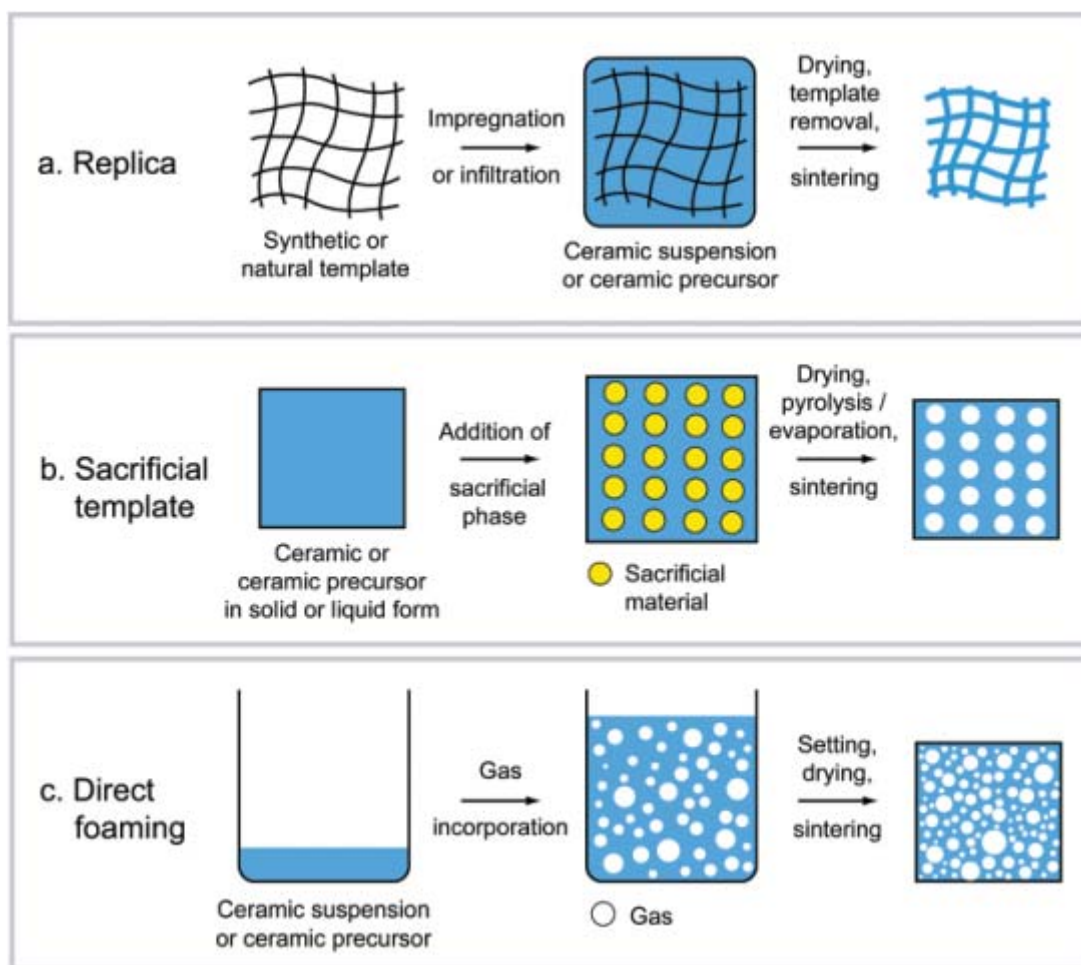


Figura 8: Esquema de diferentes posibilidades para producir cerámicas macroporosas [28]

El método de replica (figura 8a.) se basa en la impregnación de una estructura celular con una suspensión cerámica o una solución precursor de manera que se produce una cerámica macroporosa con la misma morfología que el material poroso original. Numerosas estructuras celulares naturales o sintéticas se pueden utilizar como plantilla.

El método de plantilla inversa a menudo consiste en una preparación de un compuesto bifásico que tiene una matriz continua de partículas de cerámica o precursores cerámicos y de una fase dispersa que inicialmente se distribuye de manera homogénea a través de la matriz y se extrae al final para generar poros dentro de la microestructura (figura b.). Este método resulta a materiales porosos que muestran una réplica negativa de la plantilla inversa original, contrariamente a la morfología positiva obtenida a partir del método de réplica.



En métodos de espumado directo, se producen los materiales porosos incorporando aire en un medio líquido, y posteriormente el fraguado permite mantener la estructura de burbujas de agua creadas (figura 8c.). En la mayoría de los casos, las espumas consolidadas luego están sinterizadas a temperaturas altas para obtener cerámicas porosas con alta resistencia mecánica. [28]

1.3.2. Importancia de la porosidad en ingeniería de tejido óseo

Las células son sensibles a las características de su entorno inmediato, de forma que las propiedades del medio en que desenvuelven influyen en el metabolismo celular y en el caso del tejido óseo, al proceso osteogénico.

El entorno celular natural regula el comportamiento de las células, así como sus interacciones entre sí y con la matriz extracelular, a través de estímulos principalmente mecánicos, químicos y, topográficos [29]. El mismo comportamiento se da también con un biomaterial, es decir que factores químicos, topográficos y mecánicos también determinan las interacciones celulares con un biomaterial.

La morfología del material debe imitar la del hueso, así como su estructura y sus funciones para que optimice la integración del nuevo tejido. La organización en el espacio de las células y el suministro de nutrientes son factores que también influyen en la arquitectura del material [4,25,30,31].

La regeneración ósea debe realizarse de manera tridimensional, para que los materiales que actúan como sustrato deban contener células no solo en la superficie del material, sino también al interior para mejorar la regeneración. Se puede alcanzar introduciendo poros en biomateriales ya existentes, y estos biomateriales se denominan andamios cuando actúan de sustrato durante la formación del nuevo tejido.

La porosidad y el tamaño de poros son dos parámetros importantes para la eficiencia de los andamios; una fracción importante de porosidad dentro de un material favorece la superficie en contacto con el nuevo tejido así como la adhesión. La migración y proliferación celular también se encuentra más grande, lo que aumenta la rapidez de regeneración ósea. La porosidad estimula la difusión de oxígeno y nutrientes, lo que también favorece la formación del nuevo tejido [25].

La presencia de macroporos ($>100\ \mu\text{m}$) en implantes de fosfato de calcio favorece la osteointegración, mientras que bajas porosidades impiden el crecimiento de tejido óseo nuevo [25]. Son embargo, el crecimiento del hueso no solo depende del tamaño ni de la fracción de los poros en CPC, sino también de la interconectividad que hay entre ellos. En



efecto, este parámetro es importante para que no se detengan la migración celular y la vascularización por falta de conexiones [31]. Por lo tanto, se necesita obtener una homogeneidad del tamaño de poros para que no haya diferencias de tamaño entre todas las conexiones, como se puede observar en la figura 9.

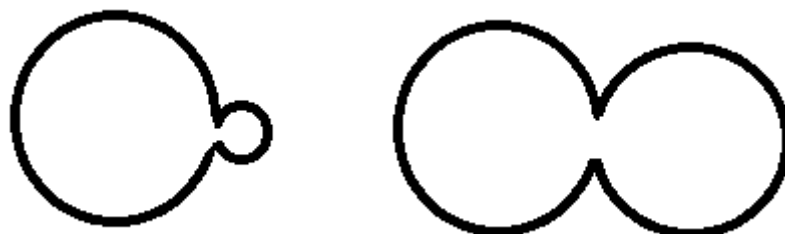


Figura 9: Influencia de los tamaños de los poros sobre los tamaños de las interconexiones

Las células que permiten una regeneración del tejido óseo como los osteoblastos tienen un tamaño de 10 a 20 micras; por tanto el diámetro de los poros debe ser más de 100 μm para que puedan caber varias células y también vasos sanguíneos.

En efecto, estos vasos irrigan en oxígeno y alimentan las células, así que esta falta de vasos puede llegar a la muerte celular y más adelante al fracaso del implante [31].

Se necesita un intervalo de tamaños de poros diferente para cada tipo de tejido para que se pueda regenerar, dependiendo del tamaño de las células implicadas en la regeneración ósea [26].

El tamaño de poro influye en el tipo de tejido que forman las células dentro del andamio. Se puede clasificar tres tendencias, cada intervalo de tamaño favoreciendo la formación de células especiales [31,32]:

- Poros menores a 40 μm favorecen el crecimiento de fibroblastos.
- Poros entre 40 y 100 μm estimulan el crecimiento de osteoide (matriz ósea).
- Poros entre 100 y 500 μm permiten la formación directa de hueso mineralizado.

Algunos trabajos han enseñado la influencia del diámetro de los poros sobre el crecimiento de determinadas células. Se ha observado que la formación osteocondral predomina con poros pequeños, mientras que los poros más grandes favorecen la osteogénesis; esto se debe a una mejor vascularización en poros grandes, es decir a una mejor difusión del oxígeno y de los nutrientes [25,33].



El tamaño mínimo de poro se sitúa a 100 μm pero subsiguientes estudios han enseñado que una mejor osteogénesis se ve con poros de más de 300 μm , porque estimulan la vascularización y la oxigenación.

Se acepta también que una fracción de poros cerca del 60% favorece el crecimiento óseo aunque esta regeneración ósea no sólo depende de estos parámetros, sino también de la geometría de los poros [25,31,32,34].

1.3.3. Espumas

1.3.3.1. Mecanismos

Hoy en día es posible producir cementos espumados, mediante la introducción de porosidad formada por aire. El interés de aumentar la porosidad en CPCs es de favorecer la regeneración ósea. Hay tres tipos de porosidad en cementos espumados: la porosidad entre cristales y la porosidad entre conformado de cristales, que constituyen la porosidad intrínseca, así como la porosidad introducida.

El método de formación de las espumas desarrollados en el Bibite (UPC) consiste en añadir un tensioactivo biocompatible (por ejemplo el Tween) en la fase líquida, espumarla por medios mecánicos durante un cierto tiempo, e incorporar delicadamente la espuma sobre una cantidad conocida de polvo, mezclarlo minimizando la rotura de las burbujas, y poner la mezcla en el molde.

El mayor problema en la preparación de espumas de CPC es la inestabilidad de las espumas, que se debe a sus grandes interfases gas-líquido. Varios procesos físicos ocurren en espumas húmedas para reducir la energía libre total del sistema, lo que conduce a la destabilización de la espuma. Los mecanismos principales son:

- Drenaje
- Coalescencia
- Maduración de Ostwald

La combinación de estos fenómenos físicos puede llevar a la destrucción de la espuma en unos segundos después de la integración del aire.

El drenaje es la separación física entre la fase líquida y la fase gaseosa por culpa de la gravedad. La coalescencia ocurre cuando las películas finas formadas después del drenaje no son suficiente estables para mantener separadas burbujas en contacto entre sí, lo que conduce a la asociación de burbujas vecinas. La estabilidad de las películas está



determinada por las interacciones de atracción y de repulsión entre burbujas. Las fuerzas de atracción de Van der Waals empujan las burbujas entre ellas y pueden producir la rotura de las películas de las burbujas. Si las fuerzas electrostáticas y/o estéricas de repulsión están suficientemente para superar las fuerzas atractivas de Van der Waals, se puede producir coalescencia. Estas fuerzas pueden ser comunicadas por moléculas de tensioactivo o partículas colocadas a la interfaz aire-agua [28].

1.3.3.2. Tensiometria

El método de la placa de Wilhelmy permite medir la tensión superficial de un líquido.

Este fenómeno se explica porque las moléculas en el seno de un líquido están atraídas entre sí por la energía molecular pero en promedio las fuerzas de atracción resultantes se anulan. Sin embargo, en la superficie hay una fuerza neta hacia el interior del líquido. Esta diferencia explica la forma esférica de una gota de agua. La tensión superficial para un líquido es la fuerza que se tiene que aplicar a un líquido para provocar la extensión de su superficie. Esta definición implica que el líquido tiene una resistencia para aumentar su superficie.

Un líquido con una baja energía superficial favorece un contacto máximo con un soporte sobre lo cual se pone, aumentando el ángulo de contacto. Un gran ángulo, así que una tensión superficial significa un carácter hidrofóbico. Se puede bajar la tensión superficial por ejemplo añadiendo un jabón, cuyas moléculas se incorporarán entre las moléculas de agua, reduciendo las tensiones entre ellas.

La unidad de la tensión superficial es el newton por metro ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$) que corresponde a los joules por metro cuadrado ($\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$) que es la unidad de energía de superficie.

Para medir las tensiones superficiales de nuestras fases líquidas se utilizó una balanza de Wilhelmy. Mediante este método se mide el peso de una placa metálica que tiene una extremidad que se moja en el líquido cuyo se quiere medir la tensión de superficie. La diferencia con el peso de la placa mantenida fuera de contacto con el líquido está dada por el perímetro multiplicado por la tensión de superficie (figura 10). Se utiliza mucho para medir diferencias de tensión de superficie después del añadido de un soluto o de una sustancia que forma capas finas sobre la superficie. La balanza utilizada es el Krüss Processor Tensiometer K100 del laboratorio de Química de superficies de Terrassa.



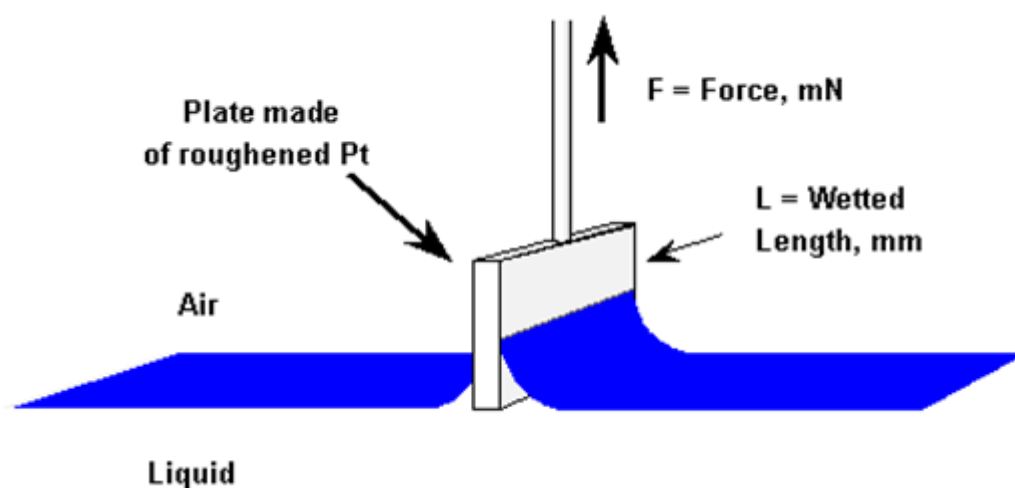


Figura 10: Esquema del funcionamiento de la balanza de Wilhelmy para la medida de la tensión superficial de líquidos.

1.3.3.3. Tensioactivos

Generalidades

Para ayudar a la formación de burbujas, y sobre todo su estabilidad, se puede utilizar un tensioactivo.

Los tensioactivos son sustancias anfifílicas cuyas moléculas están constituidas por dos partes distintas: una zona hidrófila, es decir que es soluble en agua y en solutos polares, y una hidrófoba, también orgánica y formada por una cadena no ramificada, que tiene afinidad con sustancias apolares.

El carácter anfifílico de estas sustancias llega a la formación de burbujas, llamadas micelas, cuando se mezcla agua y grasa. Así, la parte hidrófoba se pone en el interior, mientras que la zona hidrófila se queda en el exterior, formando estructuras como se puede ver en la figura 11 [35].



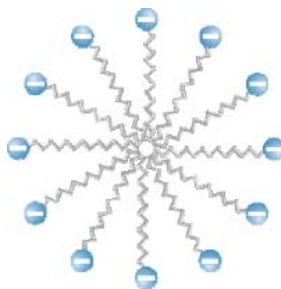


Figura 11: Disposición de moléculas de tensioactivos formando micelas

Las moléculas de tensioactivo pueden tener pesos moleculares de pocos cientos hasta varios miles de g/mol.

Existen varios tipos de tensioactivos, clasificados según la naturaleza de la cadena hidrofílica :

- Tensioactivos aniónicos
- Tensioactivos catiónicos
- Tensioactivos no iónicos
- Tensioactivos anfóteros

La ventaja principal de tensioactivos aniónicos es su capacidad para mantener propiedades constantes en disoluciones salinas a diferentes pH. Sin embargo, tienen menor poder espumante que lo de los tensioactivos no iónicos.

El poder espumante es mejor con los tensioactivos no iónicos ya que las repulsiones electrostáticas entre los dos extremos de la molécula aumentan la estabilidad de la espuma, gracias al carácter polar de la cadena hidrófoba [4].

Cuando la concentración de tensioactivo es muy pequeña, las moléculas no se orientan en la interfase. Cuando crece un poco, empiezan a orientarse pero no pueden formar micelas. Cuando se alcanza la concentración micelar crítica (CMC), se forman las micelas, ya que el número de moléculas disponibles es tal que forman una monocapa en la superficie del líquido, como se puede ver en la figura 12.



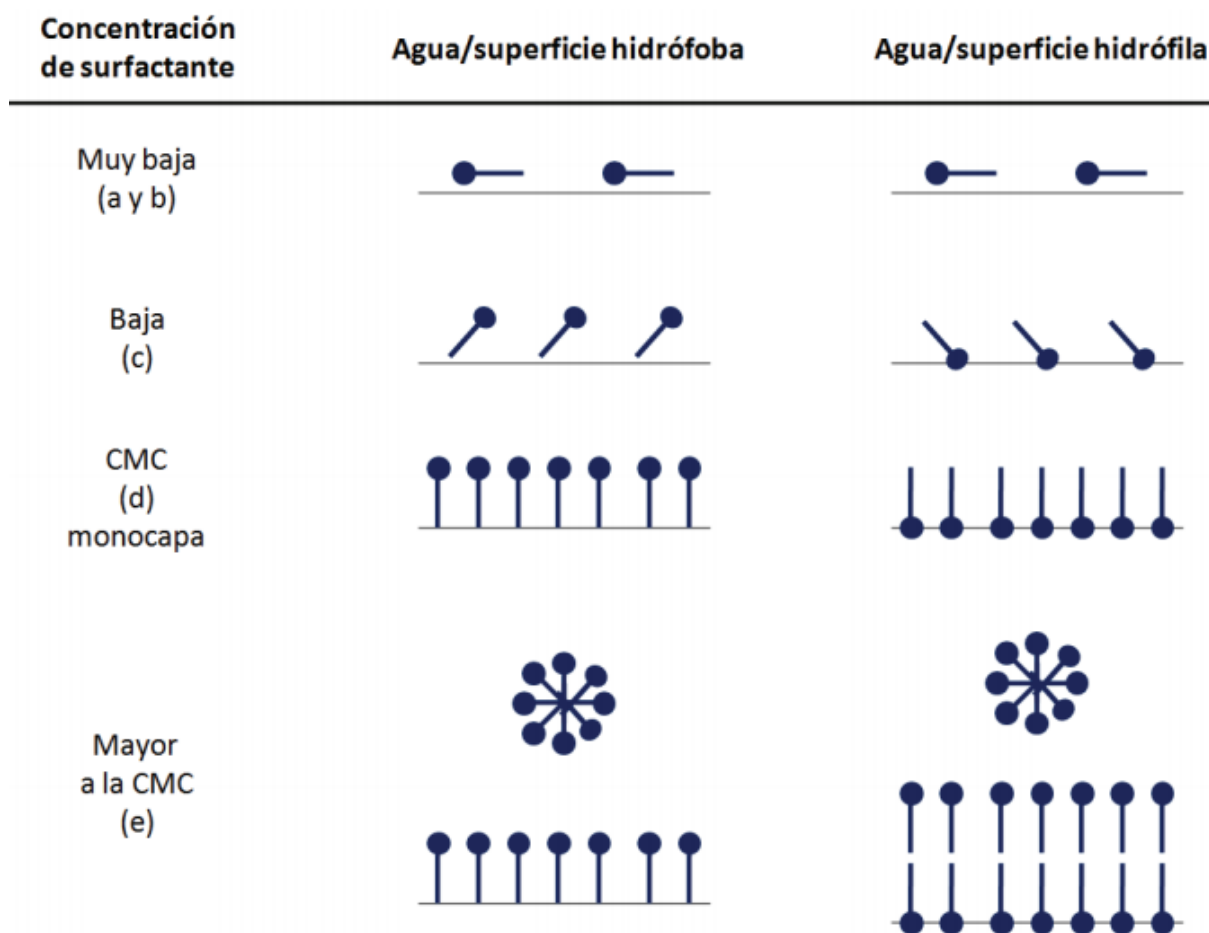


Figura 12: Adsorción de tensioactivo en superficies hidrófobas e hidrófilas en función de la concentración [35]

Un tensioactivo no iónico: Tween 80

Los tensioactivos no iónicos son moléculas que no poseen un grupo con carga definida, sino que la zona hidrófila (cabeza polar) se define por la solubilidad del grupo en agua [35].

Entre los distintos tipos de tensioactivos no iónicos, existe una clase especial que son los derivados del sorbitan (1,4-anhidrosorbitol, 1,5-anhidrosorbitol o 1,4,3,6-dianhidrosorbitol).

En esta clase se utilizan dos variedades principales:

- Las grasas ésteres ácidas de sorbitan
- Los derivados etoxilados

La primera variedad se llama comercialmente Span, mientras que los derivados etoxilados se denominan Tween, con un número que caracteriza el número de carbonos de la cadena hidrófoba [35].



El Tween 80, polioxietileno de fórmula química $C_{64}H_{124}O_{26}$ (figura 13), es un líquido amarillento viscoso con una densidad específica de 1.07 y una viscosidad de 300-500 centistokes a 25 °C.

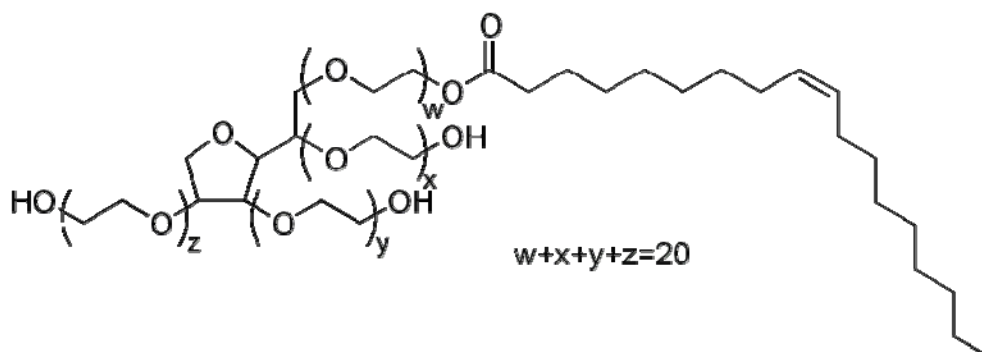


Figura 13: Molécula de Tween 80

El Tween 80 se conoce también como polisorbato 80, polioxietileno (20) - monooleato de sorbitan o PEG (80) [36] y su CMC en agua es de 13 - 15 mg/l [36]($1.3 - 1.5 \times 10^{-3} \%$ w/w; $1 - 1.3 \times 10^{-5}M$ [37]

El Tween 80 es soluble en agua, miscible en alcohol, aceite de maíz, acetato de etilo, aceite de semilla de algodón, metanol y tolueno, pero es insoluble en aceites minerales. Las disoluciones de Tween 80, al igual que el líquido puro, se oxidan al aire pero a pesar de ello son relativamente estables a temperaturas entre 2 y 8°C. Para almacenamiento prolongado se sugiere mantener en atmósfera inerte de argón o nitrógeno [36].

Las principales aplicaciones del Tween 80 son en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, entre otra, ya que está considerado como no irritante y no tóxico. Se emplea como emulsificador y dispersante de sustancias en productos médicos y alimenticios.

El Tween 80 está aprobado por la FDA para su uso como excipiente de medicamentos y vacunas de administración parenteral [38,39]. La concentración máxima de Tween 80 considerada como segura para el organismo es de 0.4 % peso/peso [40].

1.4. Utilización de CPC con antibiótico

1.4.1. Generalidades sobre antibióticos

El aumento de la esperanza de vida en países ricos ha resultado en un aumento espectacular de los problemas músculos esqueléticos, tales como osteoporosis y osteoartritis, así como problemas bucodentales. Sin embargo hoy en día hay se desarrollan medicamentos y tratamientos y técnicas para luchar contra ellos [41-43].



Nos interesaremos particularmente a los sistemas de liberación de medicamentos que permiten evitar la administración sistémica a todo el cuerpo, ya que privilegian un tratamiento local. Estos sistemas tienen que tener la posibilidad de incorporar un medicamento, liberarlo en un sitio específico de manera progresiva en el tiempo para que afecte los tejidos circundantes. Se tiene que cuidar que la velocidad de liberación sea adaptada para que la concentración no alcance un nivel tóxico o, a la inversa sea demasiado baja para tener un efecto sobre la zona a tratar [44]. La liberación de medicamentos depende de diferentes factores tales como la microestructura, el tipo de enlace entre el medicamento y la matriz que lo contiene, así que el mecanismo de degradación de la matriz.

Aunque la mayoría de los portadores de medicamentos son polímeros, materiales inorgánicos también pueden tener este papel para el tratamiento de problemas esqueléticos. Gracias a su bioactividad, los materiales basados sobre fosfato de calcio podrían ser muy útiles como sistemas de liberación para tejidos óseos. Además, tienen la capacidad de adsorber componentes químicos en su superficie, lo que favorece la purificación y separación de proteínas, enzimas y ácidos nucleídos y otras macromoléculas [45].

Por supuesto, las ventajas de los CPC explicadas previamente, tales como la inyectabilidad y el fraguado a temperatura ambiente por ejemplo, les dan una predisposición por tener el papel de sistema de liberación de medicamentos. Se pueden aplicar a los CPCs diferentes tipos de medicamentos para su liberación, por ejemplo [46]:

- Antibióticos
- Antiinflamatorios
- Hormonas
- Medicamentos anticancerosos
- Proteínas morfogénicas de hueso

Aunque esta solución parece ser una buena alternativa por el futuro, queda un gran camino hasta que sea operacional, ya que empresas de prótesis que venden CPC no tienen el conocimiento necesario en medicamentos y que empresas farmacéuticas no tienen el conocimiento necesario en CPC y tienen poco interés en trabajar en un mercado relativamente pequeño [42].



El aumento de la esperanza de vida en países ricos ha resultado en un aumento espectacular de los problemas músculos esqueléticos, tales como osteoporosis y osteoartritis, así como problemas bucodentales. Sin embargo hoy en día hay se desarrollan medicamentos y tratamientos y técnicas para luchar contra ellos [41-43].

Nos interesaremos particularmente a los sistemas de liberación de medicamentos que permiten evitar la administración sistémica a todo el cuerpo, ya que privilegian un tratamiento local. Estos sistemas tienen que tener la posibilidad de incorporar un medicamento, liberarlo en un sitio específico de manera progresiva en el tiempo para que afecte los tejidos circundantes. Se tiene que cuidar que la velocidad de liberación sea adaptada para que la concentración no alcance un nivel toxico o, a la inversa sea demasiado baja para tener un efecto sobre la zona a tratar [44]. La liberación de medicamentos depende de diferentes factores tales como la microestructura, el tipo de enlace entre el medicamento y la matriz que lo contiene, así que el mecanismo de degradación de la matriz.

Aunque la mayoría de los portadores de medicamentos son polímeros, materiales inorgánicos también pueden tener este papel para el tratamiento de problemas esqueléticos. Gracias a su bioactividad, los materiales basados sobre fosfato de calcio podrían ser muy útiles como sistemas de liberación para tejidos óseos. Además, tienen la capacidad de adsorber componentes químicos en su superficie, lo que favorece la purificación y separación de proteínas, enzimas y ácidos nucleídos y otras macromoléculas [45].

Por supuesto, las ventajas de los CPC explicadas previamente, tales como la inyectabilidad y el fraguado a temperatura ambiente por ejemplo, les dan una predisposición por tener el papel de sistema de liberación de medicamentos. Se pueden aplicar a los CPCs diferentes tipos de medicamentos para su liberación, por ejemplo [46]:

- Antibióticos
- Antiinflamatorios
- Hormonas
- Medicamentos anticancerosos
- Proteínas morfogénicas de hueso

Aunque esta solución parece ser una buena alternativa por el futuro, queda un gran camino hasta que sea operacional, ya que empresas de prótesis que venden CPC no tienen el conocimiento necesario en medicamentos y que empresas farmacéuticas no tienen el conocimiento necesario en CPC y tienen poco interés en trabajar en un mercado relativamente pequeño [42].



1.4.2. Hiclato de doxiciclina

La doxiciclina es un antibiótico de amplio espectro utilizado por tratamientos dentales, periodontales e infecciones de hueso, gracias a su fuerte actividad contra patógenos periodontales tal como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), y *Bacteroides frosthytus* (B.f.). Además, este antibiótico está recomendado para tratar enfermedades periodontales destructivas como: periodontitis juvenil, periodontitis marginal refractaria y abscesos periodontos agudos. También es muy eficaz contra bacterias gram-negativas y bacteria gram-positivas, protozoos y aneorobos varios [47].

Dos de estas enfermedades son:

- Periodontitis, que es la presencia de una inflamación gingival en sitios donde un aflojamiento patológico de fibras de colágeno del cemento ocurrió. Periodontitis lleva a la pérdida progresiva del hueso alveolar alrededor de la diente. Si no hay tratamiento puede provocar la pérdida de la diente.
- Peri-implantitis consiste en un proceso inflamatorio que afecta los tejidos alrededor de un implante osteointegrado, lo que lleva a la pérdida de hueso de soporte.

El interés del Hiclato de doxiciclina es muy grande, ya que los implantes dentales tienen un 89% de supervivencia a 10-15 años, pero la peri-implantitis e infecciones asociadas a los implantes, ocurren en un 14%. La peri-implantitis puede limitar el éxito clínico y ocasionar problemas de salud. Las especies patogénicas asociadas con periodontitis (por ejemplo ssp, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*) también lo son con la peri-implantitis. También es importante decir que el tratamiento de peri-implantitis es difícil por culpa de comunidades microbianas de la cavidad oral, que son dinámicas y entonces producen grupos de bacterias. Estos tienen la habilidad de responder dinámicamente a un tratamiento antimicrobiano. Estas comunidades microbianas pueden cambiar mucho de un paciente a otro y pueden cambiar o desarrollarse con el tiempo [48].

Las tetraciclinas (TTCH), en particular la doxiciclina (DOXY), impide la actividad de la matriz metallo-proteinasas (MMPs) y reduce la gravedad y progresión de enfermedades periodontales en modelos animales y humanos [49].

Hay dos tipos de doxiciclina. El monohidrato de doxiciclina (DOXY-m) tiene una masa molecular $M_w=462,46$, es un polvo cristalino amarillo, poco soluble en agua (1:1000–10,000 peso/peso) y muy soluble en ácidos diluidos, álcali hidróxidos y carbonatos. El hiclato de doxiciclina (DOXY-h), tiene una masa molecular $M_w=1025,89$ y es soluble en agua (1:1–10 peso/peso) [50], por lo que se utiliza más frecuentemente para estudios que requieran su disolución en medio acuoso.



Distintos ensayos revelaron que la aplicación de sistemas de liberación controlada de DOXY-h después de un tratamiento periodontal inicial o directamente en la cavidad periodontal resulta en un beneficio a nivel de enlace gingival y en una reducción significativa de profundidades de caries. Además, su uso puede contrarrestar en parte el efecto negativo del tabaco en la curación periodontal que sigue a una terapia no quirúrgica [51].

Su compatibilidad con los fosfatos de calcio así que su precio aceptable hacen del hclato de doxiciclina un antibiótico adecuado para investigación en el campo de la liberación controlada con CPCs.



2. Materiales y métodos

2.1. Antibiótico

En el presente proyecto se ha estudiado la incorporación de un antibiótico a los cementos de fosfato de calcio. El antibiótico utilizado es el Hiclato de doxiciclina (D9891, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) que abreviaremos como DOXY-h. Su fórmula química es $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl)_2 \cdot C_2H_6O \cdot H_2O$, y tiene una masa molar de 512,94g/mol. Se puede ver su estructura química en la Figura 14.

Tiene una absorbancia en situada en el dominio fluorescente del espectro con $\lambda_{max}=351nm$.

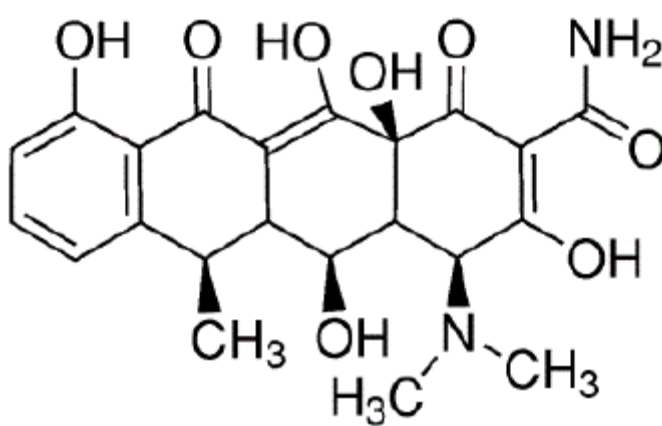


Figura 14: Estructura química del Hiclato de doxiciclina

2.2. Fases para la preparación de los cementos

Los cementos de fosfato de calcio están formados por una fase solida que, mezclada con una fase liquida, reacciona a temperatura ambiente. En este proyecto se utilizaron diferentes fases liquidas y una fase polvo para obtener cementos diferentes.

2.2.1. Fase líquida

Se utilizaron fases liquidas diferentes según las necesidades, o sea en el caso de cementos espumados o densos, o en el caso de cementos conteniendo antibiótico o no.

2.2.1.1. H_2O

Se utilizó agua mq del Millipore del laboratorio. Esta fase se utilizó solo para preparar cementos densos, con o sin antibiótico.

2.2.1.2. Solución de 1% de Tween80

Se preparó una solución al 1% en peso de Tween80 en agua mq. Se utiliza directamente para preparar cementos densos, mientras que se espuma de acuerdo con el método descrito en 2.5.2. para preparar cementos espumados.



2.2.1.3. Solución de 1% de Tween80 y Na_2HPO_4

Se preparó una solución al 1% en peso de Tween80 y 2,5% de Na_2HPO_4 (Art 131679, Panreac Quimica, Barcelona, España) en agua mq. El Na_2HPO_4 se utiliza como acelerante. Esta fase liquida se utiliza para cementos espumados que no tienen DOXY-h.

2.2.2. Fase solida

La fase solida utilizada está compuesta de 98% de fosfato tricalcico alfa (α -TCP) y de 2% de hidroxiapatita precipitada (PHA), que favorece la nucleación homogénea ya que actúa como semilla durante la reacción de hidrólisis del cemento. A estos componentes a veces añadí DOXY-h.

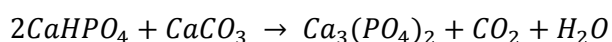
2.3. Obtención de α -TCP

Se utilizó un proceso optimizado por el equipo BIBITE para obtener el fosfato tricalcico.

- Se mezclan 131,589g de fosfato dicálcico CaHPO_4 (Art.C7263, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) con 48,399g (Art.C4830, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) de carbonato de calcio CaCO_3 con una maquina “Whip Mix” durante 10 minutos para obtener una mezcla homogénea. A continuación se mezcla manualmente para asegurar que una parte de los reactivos no se quedó bloqueada en un rincón que la mezcladora no podría alcanzar y se mezcla de nuevo cinco minutos con la mezcladora.

- Se pone el polvo mezclado en un crisol de platino y se compacta.

- Se introduce el crisol en un horno (CRN48, Hobersal S.L., Barcelona, España) para conseguir la obtención de α -TCP a través de la reacción (1), que ocurre a temperatura alta y en estado sólido.

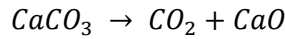


Reacción (1)

Se tiene que seguir diferentes etapas de calentamiento en el horno para llegar a la formación de nuestro producto final, de acuerdo con Figura 15.

- 1) Se aumenta la temperatura hasta 300°C en 2 horas
- 2) Se mantiene a esta temperatura durante 2 horas, lo que permite el secado de los reactivos
- 3) Se aumenta de nuevo la temperatura para alcanzar 1100°C (se necesitan 5h20). Se forma fosfato tricalcico gracias a la descomposición del CaCO_3 en dióxido de carbono (CO_2) y oxido de calcio (CaO) siguiendo la reacción (2) :





Reacción (2)

Luego el fosfato dicálcico reacciona con el fosfato dicálcico para formar fosfato tricálcico, dióxido de carbono y agua.

- 4) Para asegurar que las reacciones de formación de fosfato tricalcico de tengan el tiempo de ocurrir, se esperan 2 horas a 1100°C.
- 5) Se calienta hasta alcanzar 1400°C (2h) para que el β-TCP pueda cambiar de fase en α-TCP.
- 6) La temperatura se mantiene a 1400°C durante las 2 últimas horas, para permitir la estabilización de la fase α.

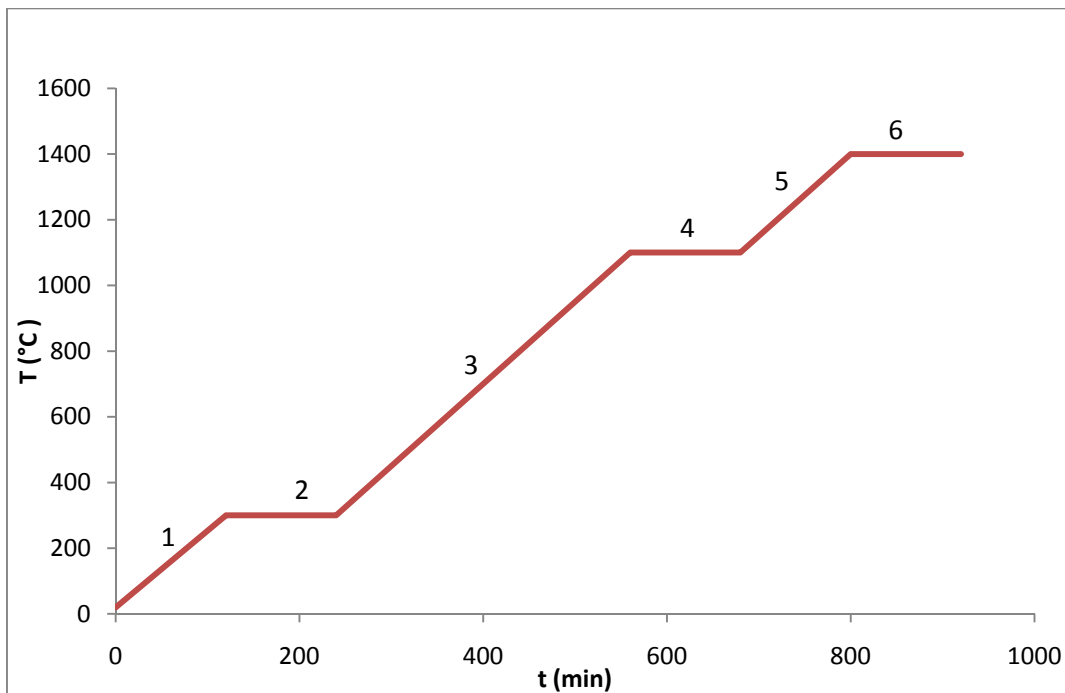


Figura 15: Ciclo térmico de sinterización del α-TCP

- Tras el tratamiento térmico se realiza un temple al aire, que consiste en golpear el bloque de α-TCP con un martillo. Se hacen pequeños trozos de α-TCP, lo que aumenta de manera significativa la superficie en contacto directo con el aire, y permite un enfriamiento rápido, que estabiliza la fase metastable de α a temperatura ambiente, evitando la transformación a β-TCP.

2.4. Preparación del polvo a utilizar

Para obtener un polvo de tamaño deseado, se utiliza un molino de ágata (Pulverisette 6, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemania). Para preparar el polvo se ponen los trozos de α-TCP en el molino, junto con 10 grandes bolas con un diámetro de 30mm. Se colocan 7 en el



fondo y 3 en la parte superior. Luego se programa el molino a 450rpm durante 15 minutos. El polvo obtenido se denominará “Coarse”.

Se saca el polvo obtenido, se pesa y se añade 2% en peso de PHA (tricalcium phosphate, Merck, Darmstadt). El PHA sirve como agente de nucleación para la reacción de fraguado entre las fases liquidas y solidas. Se mezclan bien el PHA y el polvo de α -TCP con el “Whip Mix”.

2.5. Preparación de cementos

2.5.1. Cementos densos

Para formar los cementos densos, se tiene que mezclar la fase solida en forma de polvo con la fase liquida. Siendo uno de los objetivos la comparación con los cementos espumados, elegimos la relación liquido/polvo para la cual el proceso de formación de cementos espumados está optimizado, o sea 0,55. Se suele utilizar un volumen de agua de 1mL y cambiar el peso de polvo para llegar a la RLP deseada. Entonces se pesa 1,818g de polvo α -TCP + 2% de PHA. Se han estudiado dos tipos de soluciones liquidas. La primera está agua mq solo, para hacer cementos densos clásicos, y la segunda es agua + 1% de Tween, que es la solución que utilizamos para hacer cementos espumados.

Se pone el polvo en un mortero de vidrio en el cual se añade 1mL de la fase liquida. Luego se agita enérgicamente con una espátula. Se pone la mezcla en moldes de teflón con agujeros de 6*12mm, o en los moldes específicos en el caso de ensayos de liberación (ver parte 4.2.3.). En el caso de cementos con DOXY, se mezcla el antibiótico en la parte polvo antes de poner la fase liquida.

2.5.2. Cementos espumados

Para preparar los cementos espumados se utiliza un protocolo desarrollado en BIBITE. Se explicarán las grandes etapas sin dar cantidades y tiempos precisos, ya que el proceso hasta ahora no ha sido publicado.

Se pesa la cantidad de polvo de cemento deseado en una bandeja de plástico según la relación liquido/polvo con la que se quiera trabajar.

- 1) Se espuma un volumen de fase liquida superior al deseado y se pesa la cantidad de espuma deseada.
- 2) Se mezcla la fase liquida espumada y el polvo con cuidado, de manera que no se rompan las burbujas de la espuma.



- 3) Se introduce la mezcla en los moldes de teflón de la medida deseada.

2.5.3. Protocolo durante el fraguado

Durante la fase de transformación en CDHA de los cementos densos, se decidió de utilizar el mismo protocolo que para los cementos espumados, con el objetivo de poder compararlos entre sí. Este proceso consiste en poner los moldes de teflón en atmósfera saturada de agua mQ durante 1 día, en una estufa a 37°C. Eso se hace para que no se deshagan al contacto de agua o de una otro solución líquida. Al cabo de 24 horas se sumergen en agua mQ y se mantienen a 37°C durante 14 días,

Es importante precisar que en el caso de cementos que contienen DOXY-h, este proceso únicamente sirve para cementos que se tienen que estudiar con el BET, MIP o MEB, y no para ensayos de liberación, ya que se liberaría una parte del antibiótico durante los 14 días en agua mQ.

2.5.4. Liberación de antibiótico

Para realizar los ensayos de liberación se utilizó un nuevo equipo de disolución (TDT-08L Dissolution tester, Pharma Alliance Group, USA) que llegó durante el proyecto.

El equipo permite estudiar la cinética de disolución o de liberación de principios activos y permite trabajar con 8 muestras simultáneamente. Se trabaja poniéndolas en vasos que se sumergen en un baño termostatzado. Cada vaso se cierra con una tapa (para minimizar la evaporación), a través de la cual pasa una pala agitadora que gira a la velocidad deseada, entre 0 y 200rpm. Para la extracción de muestras se utilizaron cánulas que están permanentemente en el medio de disolución. Se colocaron jeringas de 2mL (BD Discardit II) a estas cánulas para poder sacar o añadir líquido sin parar la agitación. Previamente se doblaron ligeramente las cánulas para permitir la utilización de las jeringas sin tocar la parte superior de la maquina, o sea durante el ensayo sin tener que parar la agitación.

Se utilizaron vasos color ámbar con una capacidad de 300mL que protegen las muestras, ya que la DOXY-h se degrada con la luz. De manera general, se trabaja con protección de los botes, recipientes y muestras conteniendo DOXY-h gracias a papel de aluminio.

Los vasos se llenan con 150mL de una solución de PBS (Phosphate Buffered Saline) a pH=7,4, preparada mezclando pastillas (18912-014, Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) y 500mL de agua destilada para cada pastilla, y luego se sumergen en el baño termostatzado a 37°C. Se preparan cementos en moldes de teflón con dimensiones 4*8mm (ver parte 4.2.3.). Los moldes se pesan vacíos y una vez conteniendo el cemento, para conocer el peso exacto de cada cemento.



Luego se sumergen los moldes llenos de cementos preparados más o menos 2 horas antes, y se empieza el experimento con una agitación de 100rpm o 150rpm según las necesidades.

A tiempos determinados se toma 1mL del medio de disolución para su posterior análisis por espectrofotómetro. Se añade la misma cantidad de PBS tras cada toma de muestra, con el objetivo de guardar un volumen similar. Los tiempo son cercas al principio (5 veces durante la primera hora, más una justo antes de sumergir las muestras), y luego cada 24h generalmente, hasta 96h, lo que corresponde a un ensayo del lunes al viernes.

Para evitar contaminación, se utilizaron para cada vaso 2 jeringas diferentes, una para sacar el mililitro de muestra a tiempos distintos y la otra para añadir el mililitro de PBS.



Figura 16: Fotografía de la máquina de disolución con sus vasos de color ámbar así que jeringas listas para sacar muestras



La absorbancia de las muestras se midió con un espectrofotómetro UV-Vis (Ultraviolet-visible) del Centro Nano (UV-3600, Shimadzu) y cubetas de Quarzo (104002-QS, Hellma GmbH) a la longitud de onda $\lambda=351\text{nm}$. En general las muestras se midieron el mismo día del ensayo para evitar degradación.

El primer día de cada ensayo se prepararon curvas de calibración para poder correlacionar la absorbancia medida con la concentración de DOXY-h contenidas en las muestras. Se prepararon por eso 6 soluciones con concentraciones diferentes situadas entre 0 y $100\mu\text{g/mL}$. La recta ajustada se expresa como $y=ax+b$ siendo “b” la ordenada en el origen, “a” el gradiente de la función, “x” la concentración e “y” la absorbancia. El espectrofotómetro es capaz de calcular la absorbancia de una muestra, utilizando la ley de Lambert-Beer (ecuación (4)).

$$A = \log_{10} * \frac{I}{I_0}$$

A = Absorbancia

I_0 = Intensidad del rayo incidente

I = Intensidad del rayo transmitido

Ecuación (4): Ley de Lambert-Beer

Utilizando la ecuación (5) y conociendo la absorbancia gracias al espectrofotómetro se determina la concentración por cada muestra de la manera siguiente:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia} - b}{a} \quad (5)$$

Después de un ensayo se midieron las cantidades de PBS en cada vaso, para tener en cuenta el efecto de la evaporación en los resultados.



3. Técnicas

3.1. DRX (Difracción de rayos X)

La difracción de rayos X es una técnica de caracterización estructural de sólidos no destructiva que permite conocer las diferentes fases así como sus proporciones en una muestra determinada.

La técnica consiste en la observación de la intensidad dispersada de un rayo X que incide sobre una muestra como función del ángulo incidente y difractado.

Se utiliza para caracterizar la estructura cristalográfica y la orientación preferida en muestras policristalinas o de polvo solido. Se puede utilizar para identificar sustancias desconocidas, comparando datos con una base de datos detenida por el “International Centre for Diffraction Data”. También se utiliza para caracterizar mezclas solidas heterogenias y determinar la abundancia relativa de componentes cristalinos.

El fenómeno de difracción es debido esencialmente a la relación de fases entre dos o más ondas. Las diferencias de camino óptico conducen a diferencias de fase que a su vez producen un cambio en la amplitud. Cuando un rayo X monocromático con una longitud de onda λ es proyectado sobre un material cristalino con un ángulo θ , la difracción ocurre solo cuando la distancia pasada por los rayos reflectados por planos sucesivos difiere de un número completo n de longitudes de onda, que corresponden a distancias interatómicas en la materia cristalina.

La difracción de rayos X se explica gracias a la ley de Bragg (ecuación (6)):

$$2.\lambda = 2.d_{hkl}.\sin\theta_{hkl} \quad (6)$$

λ = longitud de onda

d_{hkl} = distancia interreticular

θ_{hkl} = ángulo de incidencia entre el haz de fotones X y los planes de difracción

Variando el ángulo θ , las condiciones de la ley de Bragg son cumplidas por diferentes materiales policristalinos. Gracias a la restitución de las posiciones angulares y a la intensidad de los diferentes picos difractados se puede producir un modelo que está característico de la muestra. Cuando se ve una mezcla de diferentes fases existe, el difractograma está formado por la adición de los modelos individuales.



3.2. Microscopio óptico

El microscopio óptico es un aparato que usa la radiación visible y un sistema de lentes, realizando una imagen virtual y ampliada del objeto examinado.

Este aparato está constituido principalmente de varias lentes formando la imagen final, un objetivo que realiza la ampliación de la muestra, y un ocular. En cuanto al diafragma, regula la cantidad de luz que ilumina la muestra, variando el diámetro de apertura; así se regula la profundidad de campo, es decir la nitidez de la imagen final.

El objetivo está dispuesto en el punto focal del ocular, y se puede aumentar la imagen variando las longitudes focales de los sistemas de lentes.

La resolución de los microscopios ópticos, es decir la distancia mínima entre dos puntos para que se puedan distinguir correctamente, está limitada por un fenómeno de difracción.

Esta resolución depende de la apertura numérica (AN o A_N) del sistema óptico y de λ , según esta relación (ecuación (7)):

$$R = \frac{0,61\lambda}{n \sin u} \quad (7)$$

Donde

λ es la longitud de onda utilizada

n es el índice de refracción del medio

u es la apertura del haz electrónico

El producto $n \cdot \sin u$ corresponde al valor de la apertura numérica; así se puede incrementar la resolución aumentando el índice de refracción del medio.

3.3. BET

El BET (Brunauer, Emmett and Teller) es una técnica de caracterización para estudiar la superficie específica de un sólido a partir de la ecuación elaborada por los tres personas que dieron sus nombres a la técnica. La superficie específica (SSA) da la relación entre la superficie total de la muestra y su peso, utilizando la unidad m^2/g .

La técnica se basa sobre el principio de adsorción física de un gas inerte (nitrógeno), variando la relación entre la presión parcial del nitrógeno y de su presión de saturación a la temperatura de nitrógeno líquido. La técnica puede utilizarse en condiciones casi estáticas o dinámicas.

La muestra se pone en un sitio vacío a temperatura constante y muy baja, normalmente la de nitrógeno líquido ($-195,6^\circ\text{C}$) y está sometida a una amplia gama de presiones, para generar isoterms de adsorción y desorción.



Se mide el volumen de nitrógeno que se necesita para pasar de una presión P a una presión $P+\Delta P$. Tenemos una diferencia de volumen ΔV en exceso, que corresponde al volumen de los poros accesibles a esta misma presión P y que absorberán una parte del gas por su superficie. Al aumentar la presión accedemos a poros más pequeños. Como se conoce el tamaño de los poros accesibles según la presión aplicada, el BET permite conocer la distribución de tamaño de los poros. Gracias a la ecuación del BET (8), podemos conocer al volumen adsorbido. Se puede convertir en número de moles y luego en aire de poros, conociendo el aire de N_2 (ecuación (9)).

$$\frac{1}{v \left[\left(\frac{P_0}{P} \right) - 1 \right]} = \frac{c - 1}{v_m c} \left(\frac{P}{P_0} \right) + \frac{1}{v_m c}$$

Ecuación (8): ecuación del BET, con P y P_0 las presiones de equilibrio y de saturación del gas utilizado, v la cantidad de gas absorbido (por ejemplo en unidades de volumen), v_m la cantidad de gas adsorbida por una capa y c la constante BET.

$$S = N_A v_m \sigma$$

Ecuación (9): ecuación permitiendo de encontrar superficie específica de la muestra, con N_A el número de Avogadro, y σ la área ocupada por una molécula adsorbida ($\sigma = 16.2 \text{ \AA}^2$ por el nitrógeno)

La maquina utilizada es un BET ASAP 2020 de Micromeritics



Figura 17: Fotografía del BET ASAP 2020 del ETSEIB



3.4. FESEM (Microscopía electrónica de barrido con cañón de emisión de campo)

El FESEM (Field Emission Scanning Electron en inglés) es una técnica de microscopia electrónica basada en el principio de interacción de electrones con materia, en comparación de métodos clásicos de microscopia que utilizan la luz. Eso permite un nivel de detalles muy elevado, ya que se utilizan electrones en vez de fotones, lo que permite una disminución de longitud de onda que se utiliza para observar las muestras. También evita los problemas de profundidad de campo.

Una diferencia de potencial de 1 a 30kV en la columna del microscopio permite acelerar los electrones. Cuando se chocan con la muestra, diferentes fenómenos ocurren, tal como la emisión de electrones secundarios, de rayos X, de electrones Auger y de electrones retrodifusados. Estos pueden permitir a la caracterización de los materiales.

Cuando un electrón primero toca la superficie de una muestra, o sea a sus átomos, puede dar una parte de su energía a un electrón que no está muy unido de la banda de conducción del átomo, lo que provoca una ionización por eyección de un electrón, que se llama electrón secundario. Este tipo de electrón viene de las capas superficiales, lo que permite conocer precisamente la topografía de la muestra.

El FESEM tiene una fuente de emisión de campo hecha de una punta de un metal (generalmente el tungsteno) que sirve de cátodo, con un radio de menos de 100nm.

Se utilicen dos ánodos en el FESEM. La primera genera una diferencia de potencial entre ella y el cátodo, lo que forme un campo eléctrico concentrado a la punta que facilitara la emisión de electrones. El segundo ánodo forma lo que se llama el voltaje acelerante con el cátodo. Cuanto más rápido sea, más rápido los electrones pasan a través de la columna. También aumenta la capacidad de penetración de los electrones.

3.5. MIP (Mercury Intrusion Porosimetry)

La porosimetría con intrusión de mercurio (MIP) es una técnica utilizada para medir la distribución del tamaño de poros. Puede medir tamaños de poros en un dominio que va de nanómetros hasta varias centenas de micrómetros. Esta técnica permite tener informaciones sobre los volúmenes de poros, la densidad y la superficie específica de los poros, dando también informaciones que se pueden usar para caracterizar la forma y la estructura de los



poros. El volumen total de poros interparticulares depende de la forma y del tamaño de cada partícula y puede variar en función de si están compactados o no [52].

Se ponen muestras porosas en una cámara y se evacua la cámara. Las muestras están rodeadas por mercurio (un líquido que no está humectante) y la presión sobre él se incrementa gradualmente. Cuando la presión aumenta, el mercurio entra en los poros de la superficie de la muestra. Si existen interconexiones entre los poros, una presión suficiente puede permitir al mercurio de entrar a través de las interconexiones las más pequeñas y así llegar hasta el centro de la muestra. Sin embargo si faltan interconexiones, el mercurio podrá penetrar el volumen de la muestra rompiendo las paredes de los poros. [53]

La intrusión no se hace inmediatamente ya que el mercurio empieza a entrar en un poro cuando la presión sobrepasa el valor necesitado por el diámetro de abertura del poro pero el tiempo para que se llena depende del volumen y de la forma del poro. El modo de equilibrado permite guardar la presión estable cuando los poros se llenan, y por tanto conocer el volumen completo de poros. Sin embargo si este modo no se utiliza, los volúmenes pueden ser incompletos cuando el volumen se lee y los poros más pequeños se empiezan a llenar por culpa del aumento de presión [54].

La determinación del tamaño de poro por penetración de mercurio se basa en el comportamiento no humectante de líquidos en capilares. un líquido que no tenga un ángulo de mojadura de más de 90° no puede entrar de manera espontanea en un poro pequeño por culpa de la tensión superficial. Sin embargo esta resistencia se puede superar poniendo una presión externa. La ecuación (10) muestra que la presión necesitada es una función del tamaño de poro, la tensión superficial del mercurio y el ángulo de contacto [55]:

$$p = \frac{-2\gamma * \cos \theta}{r} \quad (10)$$

p = presión absoluta empleada

r = radio del poro

Y = tensión superficial del mercurio

Θ = ángulo de contacto (ángulo de mojadura)

Se utilizó la máquina Micromeritics Autopore IV 9500 (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, USA).



4. Resultados

4.1. DRX (Difracción de rayos X)

La calidad del α -TCP se puede medir gracias a la difracción de rayos X (DRX). Por eso se compara nuestro producto con documentos de “Joint Committee on Powder Diffraction Standards” (JCPDS), el no. 09-0348 para α -TCP y el no. 09-0169 para β -TCP.

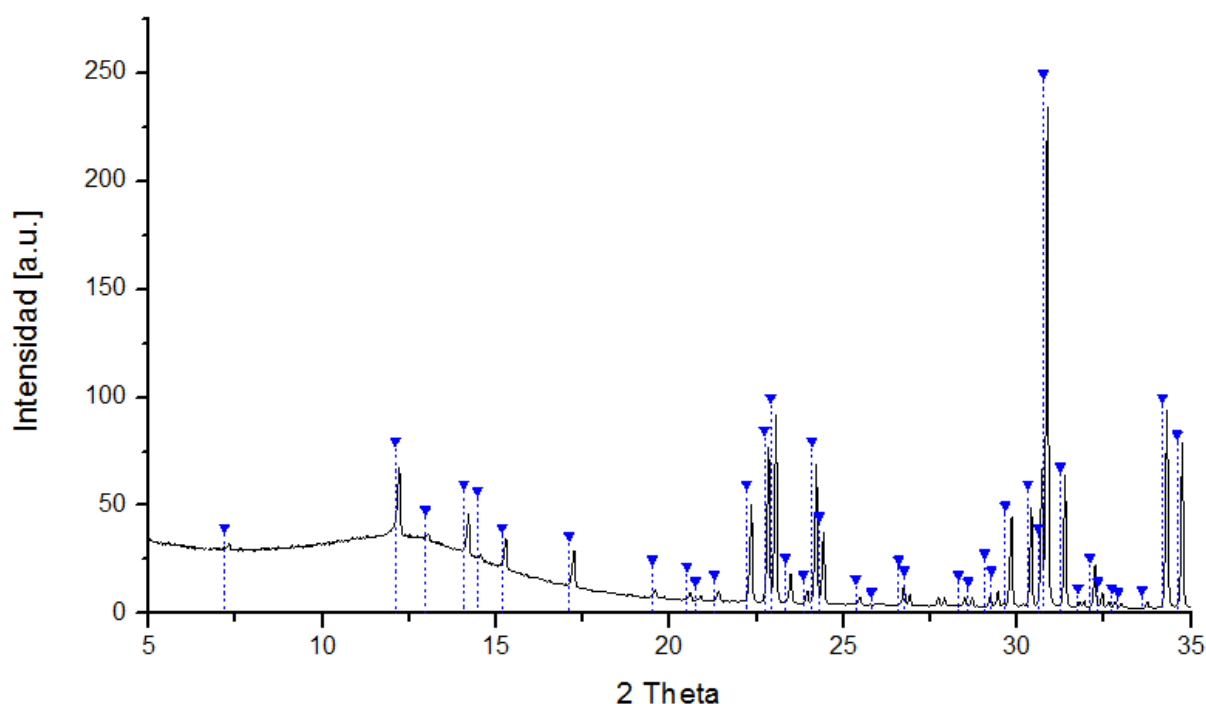


Figura 18: Resultado de un DRX de polvo de α -TCP hecha para verificar que no cambió de fase

Gracias a la plantilla oficial de composición de α -TCP, conocemos la posición exacta de los picos certificando la presencia de esta fase. Corresponden a los triángulos azules (Figura 18). Se puede destacar fácilmente que estos picos estudiados efectivamente aparecen en el análisis, con un pequeño desajuste por la izquierda. Por otro lado se compararon con los datos del β -TCP y las posiciones de los picos no coincidieron, por lo que se ha confirmado la pureza del α -TCP utilizado.

4.2. Optimización del proceso de formación de espumas con antibiótico para los ensayos de liberación

Dado que este estudio se pretende incorporar por primera vez antibiótico a cementos de fosfato de calcio espumados, es imprescindible una etapa previa en que se evalúen y optimicen los distintos parámetros de relevancia de estos materiales.



4.2.1. CPC espumados sin antibiótico

Para producir cementos espumados sin antibiótico se utilizó el protocolo desarrollado por el laboratorio BIBITE y descrito en 2.5.2.

Se utilizó una fase polvo de α -TCP Coarse conteniendo 2% de PHA, y una fase líquida H_2O + 1% de Tween80 + 2,5% de acelerante. La RLP optimizada que se ha utilizado es de 0,55. Se utilizó desmoldante sobre las paredes de un molde en teflón de medidas 5*12mm.

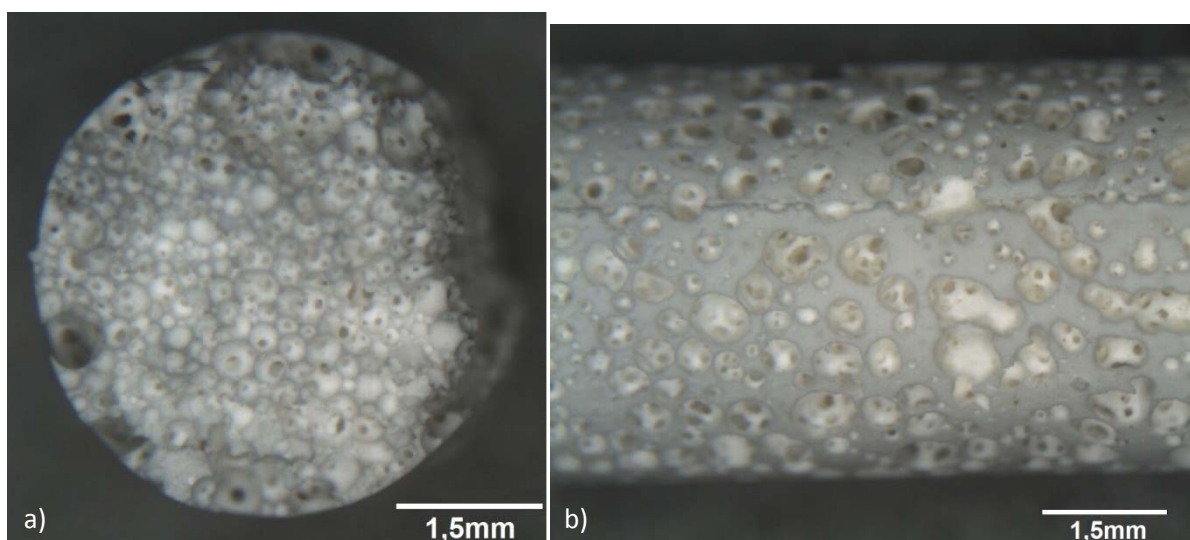


Figura 19: Fotografías a) del interior de un cemento espumado sin DOXY-h y b) de su pared exterior.

Se observa sobre la figura 19 la presencia de poros esféricos con distribución de tamaño bastante homogénea. Se observa asimismo que los poros están interconectados entre sí, lo que creemos puede ser un factor clave para la liberación de principios activos. También se destaca la presencia de poros sobre la pared exterior que pueden atribuirse a haber utilizado desmoldante.

4.2.2. Incorporación de DOXY-h a CPC espumados

Se intentó incorporar el antibiótico tanto en la fase líquida como en la fase polvo, aunque trabajos previos del grupo (en los cuales se trataba únicamente de cementos densos) habían evaluado la formación de cementos con DOXY-h incorporando el polvo de antibiótico a la fase líquida. En ambos casos pareció que la velocidad de fraguado fuera superior a la velocidad en condiciones normales. Sin embargo se destacaron algunas diferencias que se relacionan en detalle a continuación.

4.2.2.1. Incorporación de DOXY-h en fase líquida

En primer lugar se incorporó la DOXY-h en la fase líquida optimizada por el grupo para hacer espumas sin principio activos, o sea conteniendo 1% en peso de Tween así como



2,5% de acelerante. Destacó la baja solubilidad de la DOXY-h en esta solución, ya que quedaban partículas después de agitar de manera fuerte, de pasarlo en un baño de ultrasonidos y de agitarlo con un agitador magnético. Después de haber disuelto la DOXY-h tanto como fue posible, se intentó preparar cementos espumados pero se formó inmediatamente una pasta espesa casi imposible a trabajar, que atribuimos a una velocidad de fraguado muy alta.

En un segundo tiempo se eliminó el acelerante de la fase líquida. Ello resultó en una mejora de la solubilidad de la DOXY-h en la solución de Tween 80 utilizada como fase líquida. Por tanto se puede concluir que la presencia de acelerante en la fase líquida dificulta la disolución de antibiótico. Se notó una mejora neta en el proceso de CPC espumados, ya que la velocidad de fraguado ha disminuido. Sin embargo seguía siendo demasiado rápida para trabajar sin dañar las burbujas y disminuir la porosidad.

En la figura 20 se observan las diferencias entre un cemento espumado clásico sin DOXY-h, que tiene poros grandes y bastante homogéneos, y un cemento espumado formado a partir de una fase líquida con DOXY-h. Este último presenta poros más pequeños y no se observan interconexiones.

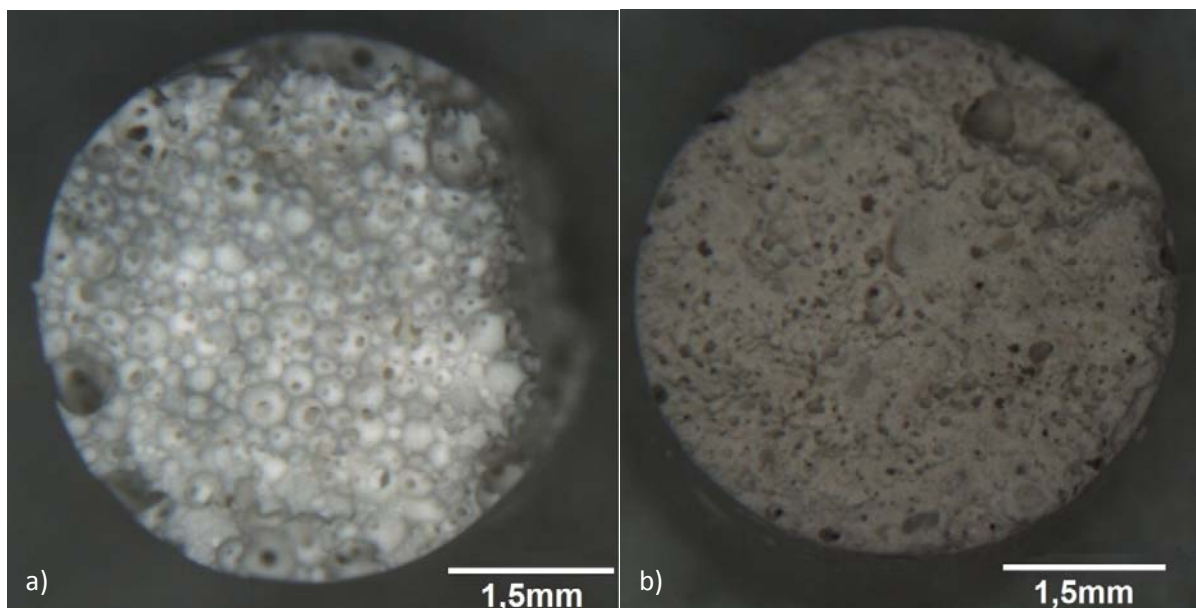


Figura 20: Diferencias entre dos cementos espumados con fase polvo α -TCP Coarse, relación Líquido/Polvo 0,55, y fases líquida diferentes: a) cemento con fase líquida H_2O + 1% de Tween80 + 2,5% de acelerante, b) cemento con fase líquida H_2O + 1% de Tween80 + 50mg de DOXY-h



4.2.2.2. Incorporación de DOXY-h en la fase solida

Se intentó poner el antibiótico en la fase polvo, con el α -TCP. El resultado fue muy positivo, ya que la pasta preparada de esta manera es mucho más moldeable y los cementos salieron mucho mejor. Eso puede ser debido a 2 grandes razones:

- La presencia de DOXY-h en la fase liquida parece reducir la espumabilidad.
- En el caso del DOXY-h en la fase liquida, cuando se pone la espuma sobre el polvo (etapa que se hace en unos segundos) toda la solución de DOXY-h impregna el polvo y la reacción empieza con la totalidad del antibiótico, mientras que si el DOXY-h está en la fase polvo, solo la parte que toca la espuma empieza a reaccionar, lo que permite ganar algunos segundos preciosos para rellenar los agujeros del molde.

Aunque los cementos salen más espumados (Figura 21) que los anteriores con DOXY-h en la fase liquida, es importante destacar que en la mayoría de los casos tampoco son tan espumados como los cementos espumados sin adición de DOXY-h (teniendo en cuenta la variabilidad inherente al proceso).

A destacar la presencia de partes más amarillas dentro de los cementos preparados con DOXY-h en fase polvo (Figura 21b) y 23). Quizás podría tratarse de cristales de DOXY-h que no han llegado a disolverse.

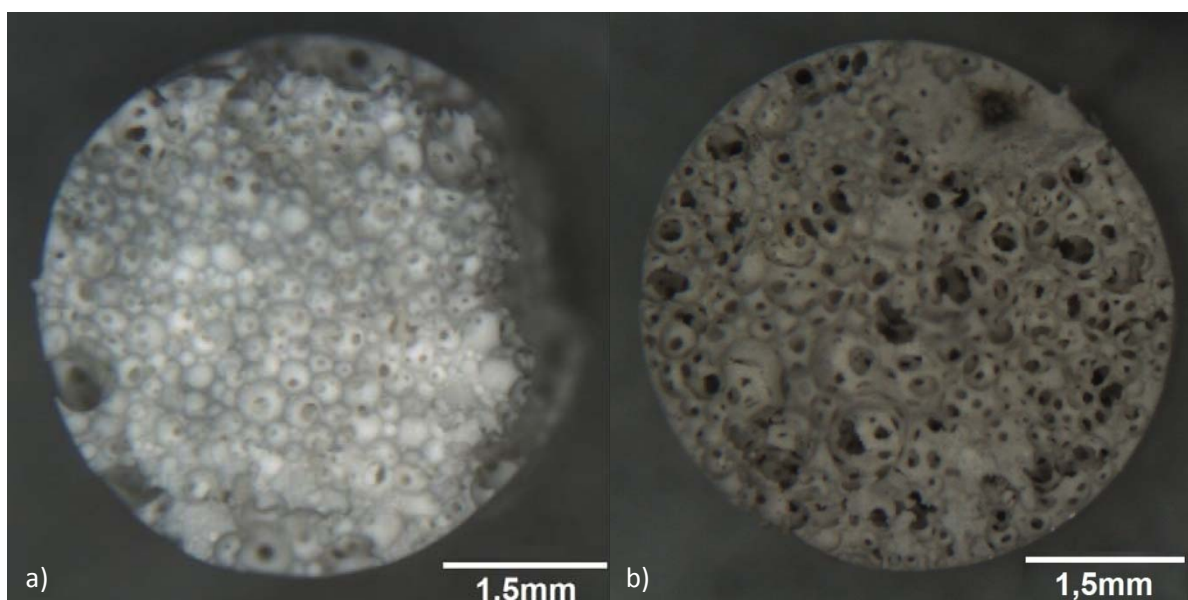


Figura 21: Diferencias entre dos cementos espumados con fase polvo α -TCP Coarse a) sin DOXY-h y b) con 50mg de DOXY-h, relación Liquido/Polvo, RLP:0,55

En la figura 21 se compara un cemento espumado sin DOXY-h con otro que se preparó con 50mg de DOXY-h en su fase polvo. El cemento que contiene DOXY-h salió particularmente



bien, y parece tener poros e interconexiones aún más grandes que el cemento clásico. Sin embargo se nota que los poros parecen menos redondos, y tienen una distribución heterogénea, ya que aún se observan pequeñas partes densas.

4.2.2.3. Otros intentos para disminuir la velocidad de fraguado

Utilización de α -TCP sin PHA

Se intentó de reducir aún más la velocidad de fraguado con el objetivo de obtener una pasta más fácilmente utilizable, y disponer de más tiempo para rellenar los moldes sin tener que apretar mucho. Por tanto se intentó utilizar α -TCP sin el 2% de PHA, que actúa como nucleante en la reacción de fraguado. Sin embargo no se notó ninguna mejora, y también se perdió una gran parte de la porosidad (Figura 22), por lo que se descartó esta vía.

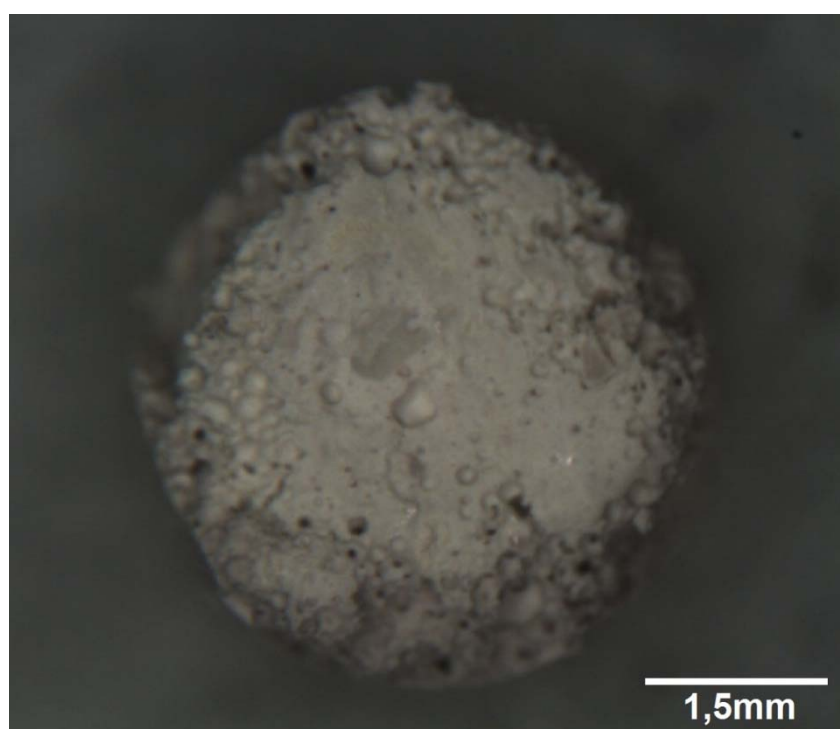


Figura 22: Fotografía de un cemento espumado con fase polvo α -TCP Coarse sin PHA, y fase líquida con H_2O , 1% de Tween80 y 50mg/mL de DOXY-h, con RLP:0,55.

Utilización de un retardante

Por culpa de la fragilidad de estos cementos (que suponemos debida a la falta de mezcla de los dos fases), se intentó encontrar otra manera de reducir la velocidad de fraguado mediante la utilización de un retardante. Después de haber buscado en la literatura y en base a la experiencia del grupo BIBITE, se eligió utilizar de $CaHPO_4$, en la fase polvo (se intentó con 5% y 10%). No pareció que cambiara mucho el tiempo de fraguado aunque, sin embargo aumentó la fragilidad final. En la Figura 23 se observa también el problema de



las paredes que quedan parcialmente adheridas al molde, el carácter no homogéneo de la porosidad, así como la presencia de las partes amarillas evocada en la parte 4.2.2.2.

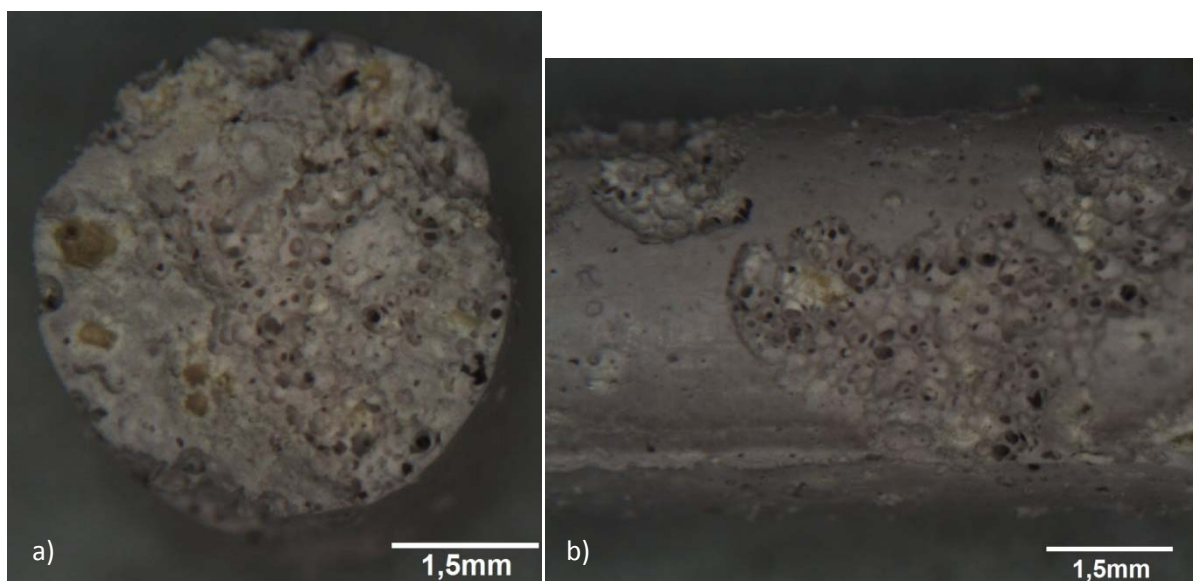


Figura 23: Fotografía del interior (a) y de la pared exterior (b) de un cemento espumado con fase polvo α -TCP Coarse + 50mg de DOXY-h+ 10% de CaHPO_4 , y una fase líquida con H_2O + 1% de Tween80, con RLP:0,55.

4.2.2.4. Formulación optimizada

Como se consiguieron porosidades mucho más elevadas con DOXY-h en la fase polvo, respecto a las conseguidas en la fase líquida, se decidió trabajar con DOXY-h en la fase sólida.

Con el objetivo de tener más tiempo para manipular las espumas de CPC e introducirlas en los moldes sin perder la macroporosidad de los cementos espumados, se decidió trabajar sin acelerante. La otra ventaja de este nuevo método es que se elimina un parámetro que hubiera podido influir en la liberación de antibiótico: la presencia de acelerante.

Se decidió continuar trabajando con α -TCP conteniendo un 2% de PHA y no añadir retardante, ya que estos cambios no ayudaron a tener resultados mejores. Por tanto, la formulación optimizada que se utilizará para preparar espumas para su posterior caracterización y para los estudios de liberación de fármacos es:

- Cementos sin DOXY-h (tipo E):
 - Fase sólida: α -TCP conteniendo 2% de PHA
 - Fase líquida: $\text{H}_2\text{O}_{\text{mQ}}$ con 1% en peso de Tween 80 y 2,5% de acelerante



- Cementos con DOXY-h (tipo AE):
 - Fase solida: α -TCP conteniendo 2% de PHA + 50mg de DOXY-h
 - Fase líquida: H_2O_{mQ} con 1% en peso de Tween 80

4.2.3. Optimización de los moldes/recipientes para el fraguado de las espumas con DOXY-h

En vistas a estudios de liberación se tuvo que optimizar la preparación de espumas con CPC con DOXY-h. En efecto no se puede utilizar desmoldante por este tipo de ensayo porque añade problemas suplementares.

4.2.3.1. Efecto del desmoldante

Efecto sobre las paredes

Con los cementos espumados sin DOXY-h se utiliza habitualmente desmoldante. Como se podía prever ayuda a desmoldar, pero también permite tener paredes porosas, lo que creemos que en el caso de ensayos de liberaciones puede ser relevante. Para los cementos con DOXY-h, no se utiliza desmoldante, ya que no queremos añadir un efecto más que podría influir en los ensayos de liberación. Se cree que la capa de desmoldante podría dificultar la liberación de DOXY-h. Sin embargo, la eliminación de desmoldante está decisión implica que las paredes sean densas (Figura 24), aunque el interior está poroso.

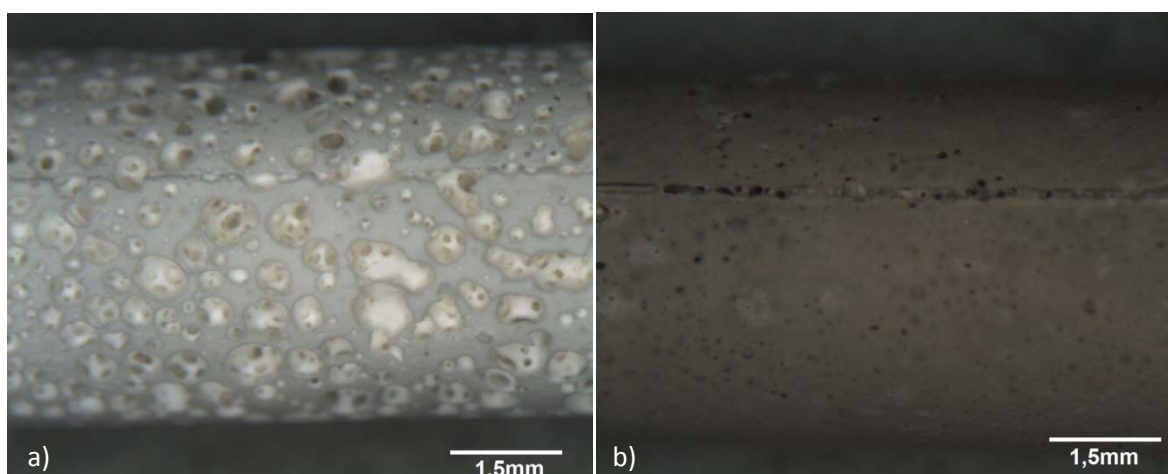


Figura 24: Diferencias entre la pared exterior de a) un cemento espumado sin DOXY-h y con desmoldante y b) un cemento espumado con DOXY-h y sin desmoldante



Problemas al desmoldar

La ausencia de desmoldante en los moldes de cementos espumados con DOXY-h lleva problemas para desmoldar. A veces los cementos se rompen totalmente, y a veces conservan más o menos su forma, pero partes de la pared exterior se quedan pegadas en el molde, lo que introduce una variabilidad indeseada.

Se piensa que los problemas para sacar los cementos de los moldes sin romperlos y el hecho que los cementos se deshacen al contacto del agua después de ser desmoldados están ligados con el problema de velocidad de fraguado demasiado rápida. En efecto tenemos menos tiempo para mezclar bien las fases polvo y líquido, lo que puede dar luego a un cemento con partes hechas con casi solo polvo o casi solo espumas. Este fenómeno resulta en una fragilidad importante y una heterogeneidad de los cementos producidos.

Eso es un gran problema para los ensayos de liberación, ya que la pared exterior tiene partes “cerradas” como se puede ver sobre la y partes porosas, directamente debajo de lo que se quedó pegado en los moldes. Se puede ver un ejemplo en la figura 24b). Este fenómeno, que nos dará superficies de contacto cada vez diferentes no es aceptable para los ensayos de liberación.

4.2.3.2. Influencia del molde utilizado

Para intentar encontrar una solución que permitiera desmoldar los cementos sin romperlos así como para intentar tener una pared exterior porosa, se evaluó la utilización de moldes de diferentes materiales o formas.

Molde de teflón con tornillos 5*12mm

Estos moldes son los que se utilizan habitualmente para los cementos espumados sin DOXY-h. Cuando se utilizan para cementos con antibiótico y sin desmoldante, se obtienen paredes densas, y que dificultan el desmolde, con partes de la pared exterior que quedan adheridas sobre el molde. Se intentó también mojar los moldes en la solución de H₂O + 1% de Tween, para ver si sería más fácil sacarlos sin dañarlos y también para ver si se quedarán densas en las paredes o si permite que fueran espumadas, pero no se observaron diferencias destacadas.

Molde de teflón cerrado 6*12mm

Estos moldes se utilizan normalmente para la preparación de cementos densos, con o sin DOXY-h. Cuando se evaluó su utilización para cementos espumados con antibiótico y sin



desmoldante, se obtuvieron paredes densas. Ya que utilizamos el método de los cementos densos para sacarlos, no hay problemas de pared que se queda pegada. Sin embargo, los cementos se estropean un poco en los bordes y también hay el riesgo que la presión aplicada para sacarlos provoque un cierto colapso de parte de los poros aunque de forma poco perceptible.

Pipeta pasteur de plástico

Como alternativa a los moldes convencionales de teflón se intentó utilizar las paredes interiores de pipetas pasteur de plástico como molde para estudiar la influencia del material elegido como molde. Es posible que las diferencias en las propiedades de mojado de distintos materiales permitan alterar la interfase entre el material y la espuma. Se han precortado para permitir desmoldar más fácilmente. Aunque no sean tan grandes como las obtenidas con desmoldante en moldes de teflón, se observan burbujas muy pequeñas en la pared exterior. Sin embargo los problemas al desmoldar no se resolvieron con este método (Figura 25).



Figura 25: Fotografía sin aumento de un cemento espumado hecho con fase polvo α -TCP Coarse + 50mg de DOXY-h, y fase líquida con H_2O + 1% de Tween80, con RLP:0,55. No se ha utilizado desmoldante sobre las paredes del molde. Se utilizó una jeringa de plástico como molde.

Pipeta pasteur de vidrio

De forma alternativa se intentó utilizar las paredes interiores de jeringas de vidrio. Para sacar los cementos decidimos romper cuidadosamente el vidrio de la pipeta. Se hicieron dos ensayos, uno con una jeringa de vidrio normal, y el otro con una jeringa de vidrio previamente mojada en la solución de agua + 1% de Tween 80. Esto último permitió poner la



mezcla de α -TCP y solución sin tener que apretar tanto. Ello permite ganar tiempo y tener una porosidad más grande al no romper las burbujas. Se observaron burbujas en las paredes de los cementos hechos en jeringas de vidrio, de mayor tamaño respecto a las de plástico. Sin embargo el vidrio utilizado era demasiado espeso y no se pudo romper para extraer los cementos sin dañarlos, por lo que el método no se considera óptimo.

Molde individual de teflón, 8*4mm

Por culpa de los múltiples problemas al desmoldar, se decidió utilizar moldes individuales y ponerlos enteros en los vasos, sin desmoldar. En la figura 26 se detalla su diseño. Tienen solo una cara en contacto con el PBS disponible para liberar el antibiótico, la otra siendo cerrada. Esta superficie en contacto mide 8mm de diámetro y tiene una profundidad de 4 mm. El hecho de que sean en teflón permite que los moldes queden bien colocados al fondo de los vasos, evitando problemas de flotación de las muestras o en vez de golpear las paredes por culpa de la agitación. De esta manera se asegura de que pequeñas partes del cemento no se rompan y cambian la superficie en contacto, lo que aumentaría la liberación. Este sistema también permite una superficie porosa para los cementos espumados.

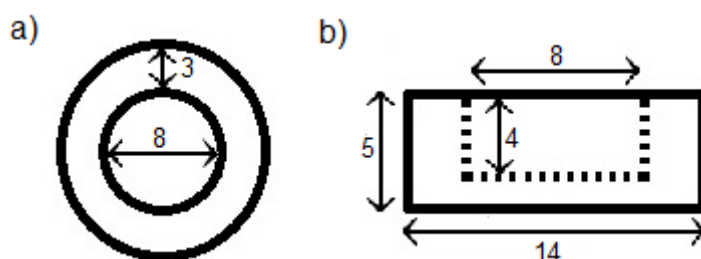


Figura 26: Esquema del diseño de los moldes individuales a) por arriba y b) de perfil

4.2.4. Evaluación del comportamiento de las espumas en condiciones de ensayos de liberación

Previamente al diseño de los moldes específicos para liberación, se evaluó el comportamiento de los cilindros de espumas de CPC bajo las condiciones del ensayo de liberación (37°C, agitación).

Uno de los problemas del ensayo de liberación es que cuando el cemento es sometido a una agitación, en algunos casos el cemento puede deshacerse. Además en el caso de espumas, el cemento es aún más frágil.

En primer lugar se hicieron ensayos con cementos espumados sin antibiótico, ya que tiene un precio elevado. El objetivo estaba de tener una idea de cómo los cementos espumados



pueden comportarse en condiciones de ensayo de liberación antes de hacer ensayos incorporando DOXY-h. Primero se hicieron cementos espumados con 1% de Tween 80 y 2,5% de acelerante. Se intentó abrir los moldes a diferentes tiempos de fraguado para ver como aguantarían en la solución de PBS con agitación. Los tiempos elegidos fueron de 2 horas, 3 horas y 1 día. Después de 2 y 3 horas, fue imposible abrir los moldes sin romper las muestras.

Por tanto el ensayo se ha hecho con cementos que habían fraguado una noche. Se estableció una agitación de 50 rpm (revoluciones/minuto) y temperatura de 37°C. A destacar que la espuma permaneció intacta durante las 3,5h de la prueba.

El segundo ensayo se hizo con un cemento espumado preparado a partir de una solución de Tween 80 y DOXY-h (50mg/ml) como fase líquida. Aunque las espumas no se degradaron después de 5 horas a 50 rpm, el resultado no es completamente aprovechable, ya que el cemento fue un poco denso (ver parte 4.2.2.1) y no es la formulación optimizada que se utilizará finalmente.

Después de la optimización del procedimiento de formación de cementos espumados con DOXY-h en la fase sólida, todos los cementos se rompieron al simple contacto del agua, ya que eran bastante porosos y fragilizados por la operación de desmolde.

En algunos casos se observó que los cementos espumados sin DOXY-h flotaban. Para los ensayos de liberación, tienen que estar totalmente sumergidos en el PBS, por lo que el dispositivo diseñado (Figura 26) es adecuado y soluciona también este problema.

4.3. Tensión superficial de las fases líquidas

Para intentar comprender porqué la presencia de DOXY-h parecía impedir o dificultar un espumado óptimo, se midió la tensión superficial gracias a una balanza de Wilhelmy.

Se compararon las tensiones superficiales (γ_L) de agua mQ, de agua mQ conteniendo 1% en peso de Tween80 y de agua mQ conteniendo 1% en peso de Tween80 y 50mg/mL de DOXY-h.

Se obtuvieron los resultados siguientes de tensión superficial para las diferentes fases líquidas en la tabla 1.



	γ_L (mN.m ⁻¹)
H ₂ O _{mQ}	73,02
H ₂ O _{mQ} + 1% Tween 80	38,27
H ₂ O _{mQ} + 1% Tween 80 + 50mg/mL de DOXY-h	40,44

Tabla 1 : Tensión superficial de distintas soluciones en función de los componentes de la fase líquida

Como se podía prever, la tensión superficial disminuye con la adición del Tween80. Aunque la tensión superficial aumenta ligeramente cuando se añade el antibiótico, la diferencia (5,7%) podría estar dentro del error inherente a la preparación de distintas soluciones, por lo que es insuficiente para concluir que es la razón de las dificultades a espumar de manera similar.

4.4. Superficie específica

Para los diferentes ensayos de caracterización se utilizaron 6 tipos de cementos diferentes.

Todos fueron preparados con α -TCP de tipo Coarse y con una RLP de 0,55. Para facilitar las explicaciones se incorporaron abreviaciones para las diferentes muestras utilizadas:

Abreviación	Fase sólida	Fase líquida	Tipo de cemento
D	α -TCP con 2% PHA	H ₂ O _{mQ}	Denso
DT	α -TCP con 2% PHA	H ₂ O _{mQ} + 1% Tween80	Denso
E	α -TCP con 2% PHA	H ₂ O _{mQ} + 1% Tween80 + 2,5% acelerante	Espumado
AD	α -TCP con 2% PHA + 50mg/ml DOXY-h	H ₂ O _{mQ}	Denso
ADT	α -TCP con 2% PHA + 50mg/ml DOXY-h	H ₂ O _{mQ} + 1% Tween80	Denso
AE	α -TCP con 2% PHA + 50mg/ml DOXY-h	H ₂ O _{mQ} + 1% Tween80	Espumado

Tabla 2: lista de abreviaciones de cementos en función de sus componentes

En la tabla 3 se presentan las diferentes superficies específicas obtenidas para cementos con la misma relación liquido/polvo 0,55 y el mismo tipo de polvo α -TCP Coarse, en función de la fase líquida con la cual fueron preparados, teniendo DOXY o no y siendo espumados o no.



	Superficie específica (m ² /g)	
	Sin DOXY-h	Con DOXY-h
H ₂ O	19.57 (D)	29.66 (AD)
H ₂ O + 1% Tween 80	19.93 (DT)	27.34 (ADT)
Espuma (H ₂ O + 1% Tween 80)*	15.81 (E)	26.83 (AE)

Tabla 3: Influencia de la composición y del espumado sobre la superficie específica

*Adición de acelerante en los cementos sin DOXY-h

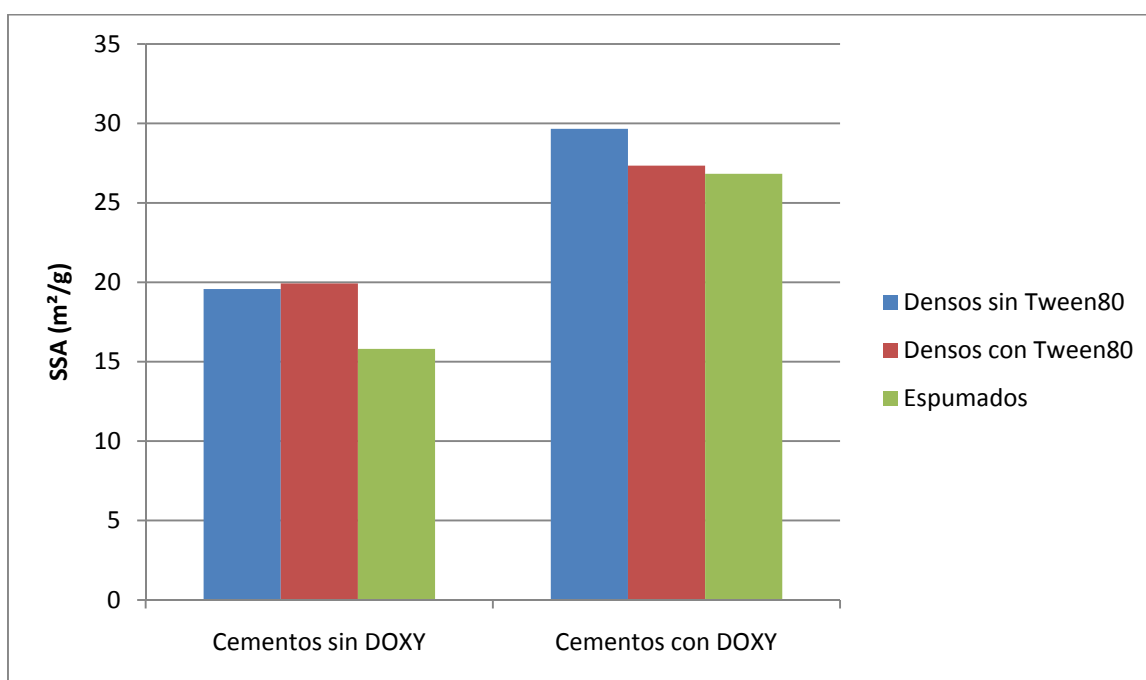


Figura 27: Influencia de la composición y del espumado sobre la superficie específica

Se observa que las SSA de los cementos densos sin o con Tween80 son bastante similares entre sí. Se hubiera podido pensar que la agitación manual del α -TCP con una fase líquida conteniendo Tween podía añadir algunas burbujas o sea porosidad y por eso cambiar la SSA. Sin embargo parece que este fenómeno es despreciable, ya que como puede observarse en las micrografías FESEM, la solución de tensioactivo agitada a mano únicamente hace aparecer algunas burbujas aisladas.

Para los cementos sin DOXY-h, si se comparan los cementos conteniendo los mismos elementos, o sea con el Tween, hay una disminución de 20,7% al espumar. Se explica por la microporosidad superior de los cementos que no están espumados, ya que tienen un gran porcentaje de porosidad visible. Diferentes estudios mostraron que la SSA aumentaba con el incremento del tamaño de la microporosidad hasta un tamaño del orden del nanómetro y



luego disminuye [56]. Nuestros poros siendo del orden de los micrómetros o más, se verifica la lógica de una disminución de SSA con el hecho de espumar.

Esta disminución no se observa tanto en los cementos con DOXY-h, cuya SSA disminuye un 1,9% solo al espumarlos. Ello se puede explicar por el carácter amorfo de los cementos densos con Tween 80 y DOXY-h en su composición, que se observó en las micrografías de FESEM (ver parte 4.5.). Otra razón puede ser las dificultades encontradas para espumar cementos con DOXY-h, que nos da generalmente cementos menos espumados.

Comparando respectivamente cementos de cada tipo sin y con antibiótico, se observa un aumento de SSA significativo con la presencia de DOXY-h. Por tanto podría tener un efecto que favorece la nucleación frente al crecimiento de cristales, lo que lleva a cristales de menor tamaño, como se puede observar en algunas imágenes de FESEM (Figura 28 d). Las espumas aumentan de 69,7% con la adición de antibiótico, mientras que los densos con Tween aumentan de 37,2% y los densos sin Tween de 51,6%.

4.5. Microscopia electrónica

Se hicieron micrografías con el FESEM para conocer los efectos de los diferentes componentes sobre la microestructura de los cementos.

A continuación se presentan las imágenes comparando siempre formulaciones equivalentes sin y con DOXY-h.

En la figura 28Figura 28 se observa que los cementos densos D y AD presentan una microestructura muy similar. Ambos tienen placas que se forman típicamente cuando se utiliza polvo Coarse como material de partida, así como algunos cristales en forma de agujas. Sin embargo parece que el cemento AD presenta mayor número de agujas. Eso puede ser debido a que la DOXY-h puede favorecer la nucleación frente al crecimiento de cristales, hecho que ya se apuntó en la parte de optimización (4.2.), al observar que la velocidad de fraguado aumenta con la presencia de DOXY-h.



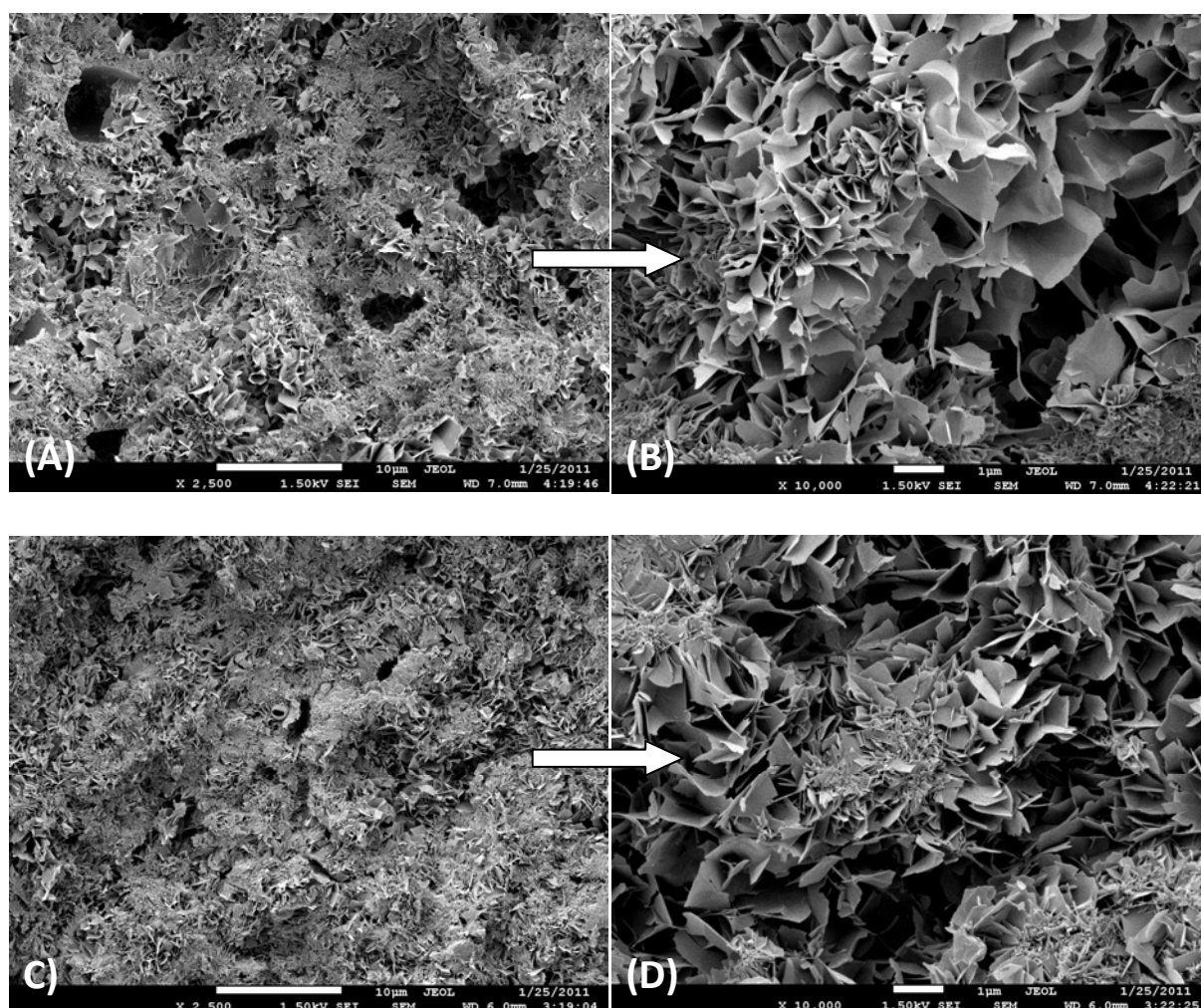


Figura 28: Micrografías de FESEM mostrando secciones de cementos a dos aumentos diferentes: (A) D X2500 (B) D X10000 (C) AD X 2500 (D) AD X10000



Se observa en la figura 29 una diferencia neta entre los cementos DT y ADT. La microestructura del DT contiene básicamente cristales en forma de placa, y por tanto es bastante similar a la de los cementos D (comparando Figura 28B y Figura 29B).

El cemento conteniendo DOXY-h parece muy amorfo y no se observa la formación de placas o agujas. Parece que el Tween 80 en presencia de DOXY-h dificulta la cristalización.

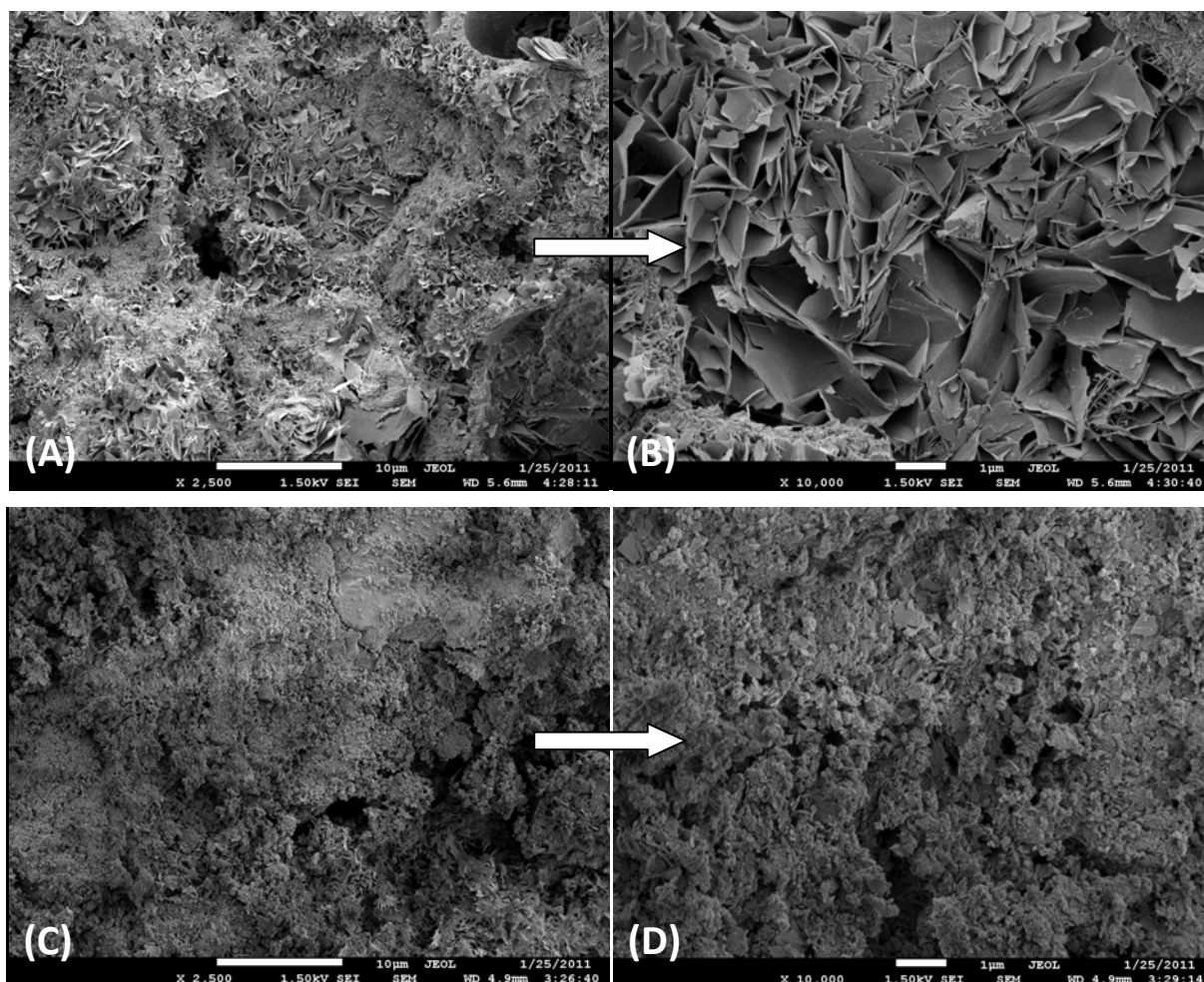


Figura 29: Micrografías de FESEM mostrando secciones de cementos a dos aumentos diferentes: (A) DT X2500 (B) DT X10000 (C) ADT X 2500 (D) ADT X10000

En la figura 30 se observa el aspecto general de los cementos espumados E y AE. Se destaca una mayor heterogeneidad en el caso de AE, así como una mayor interconectividad. Sin embargo no se puede concluir de manera unívoca que se observará este perfil cada vez, debido a la gran variabilidad inherente al proceso de espumado de cementos.



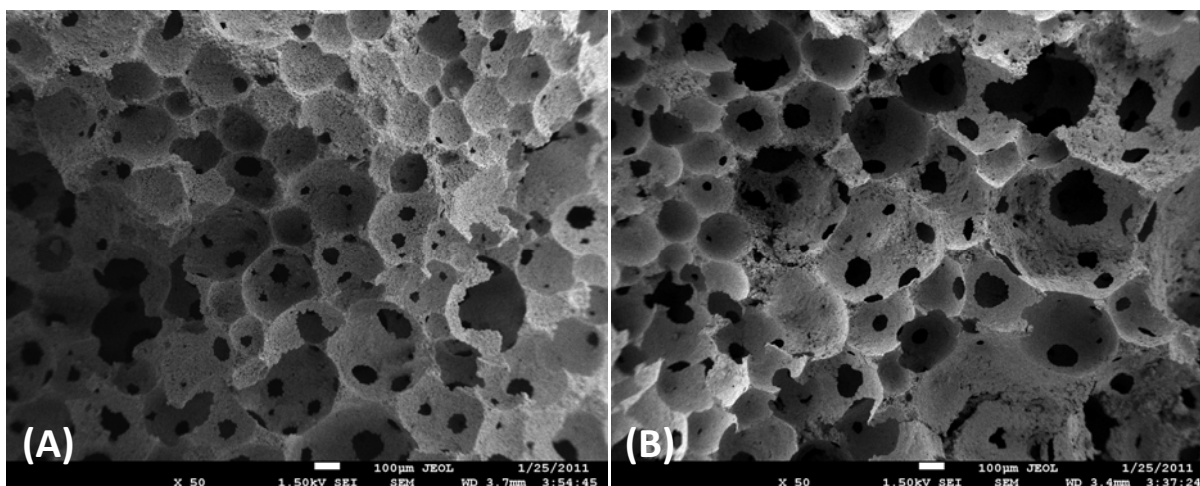


Figura 30: Micrografías de FESEM mostrando el aspecto general de los poros de cementos espumados: (A) E X50 (B) AE X50

En el caso de las espumas, se analiza más en detalle tanto la zona del interior (Figura 32) de los poros, como de la zona de fractura (Figura 31). En el caso de cementos E, se observan estructuras cristalinas organizadas en forma de esferas, lo que corresponde a un crecimiento alrededor del α -TCP. El cemento E parece totalmente cristalizado, destacando la presencia de gran cantidad de agujas pequeñas, en contraste a las placas de mayor tamaño encontradas en los cementos densos (Figura 28B Figura 29B). En la zona de fractura del cemento AE, se encuentran mayoritariamente placas, pero están mucho más desorganizadas, no forman bolas, y forman una estructura que se parece más a la de los cementos densos.

Tampoco se observan zonas amorfas grandes y por eso no se puede confirmar que el Tween 80 en presencia de DOXY-h impida la cristalización, como se apuntaba en vistas a la figura 29. Se cree que este efecto puede ser debido a la posición de las moléculas de Tween 80 en el cemento. Es decir, en el caso de espumas las moléculas se reorganizan alrededor de las burbujas, de modo que las zonas entre los poros (zona de fractura) tienen menor cantidad de Tween 80 y pueden cristalizar más libremente.



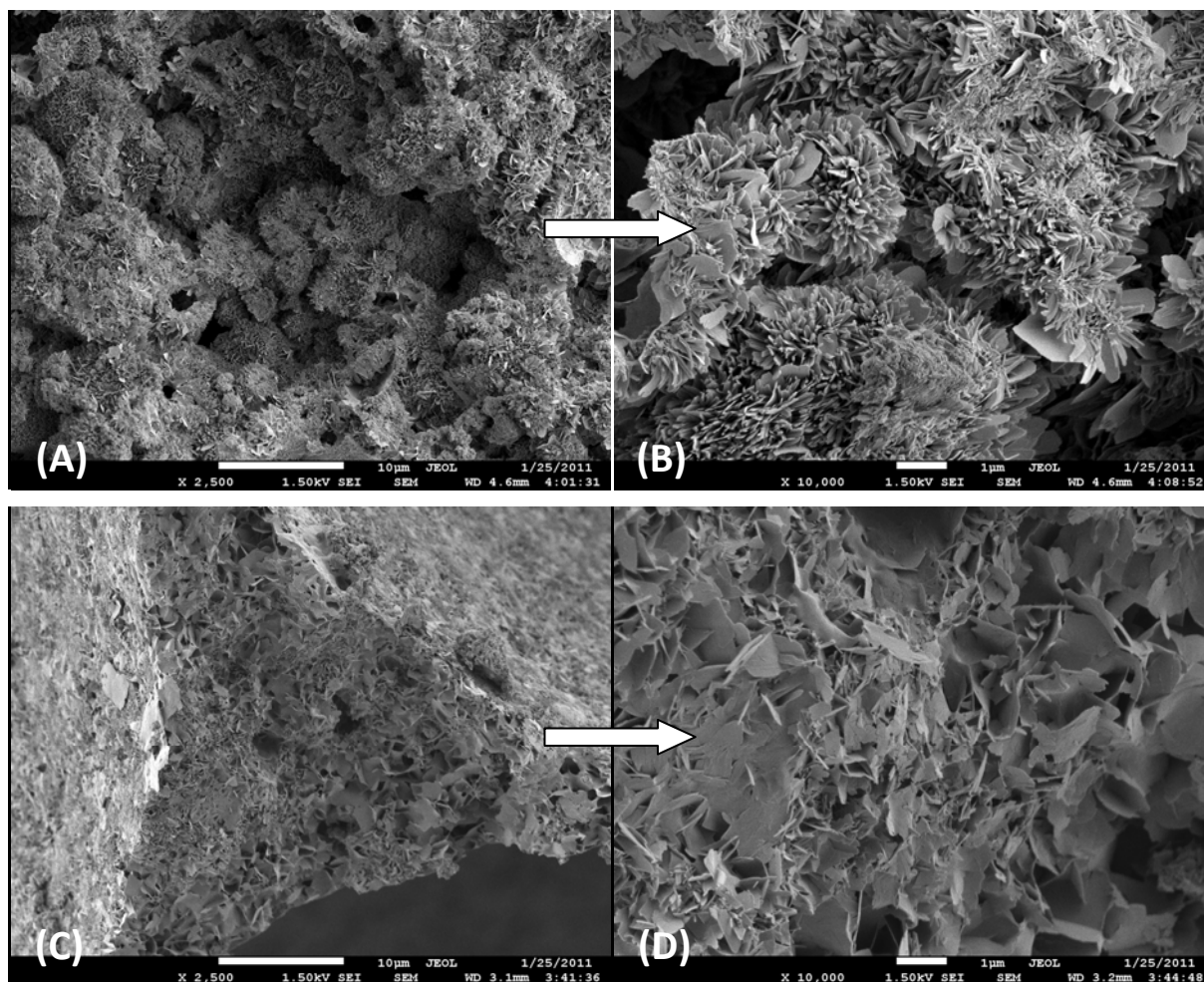


Figura 31: Micrografías de FESEM mostrando zonas de fractura en espumas a dos aumentos diferentes: (A) E X2500 (B) E X10000 (C) AE X 2500 (D) AE X10000

La superficie de los poros que se pueden observar en la figura 32 son muy diferentes en el caso de espumas E o AE. En el primer caso también se observa la formación de esferas como en la zona de fractura, pero son formadas únicamente por agujas finas, lo que indica que ha predominado la nucleación frente al crecimiento cristalino.

El cemento AE tiene una superficie de poro muy plana. Se observan agujas y placas que parecen como achatadas para formar un único plano.



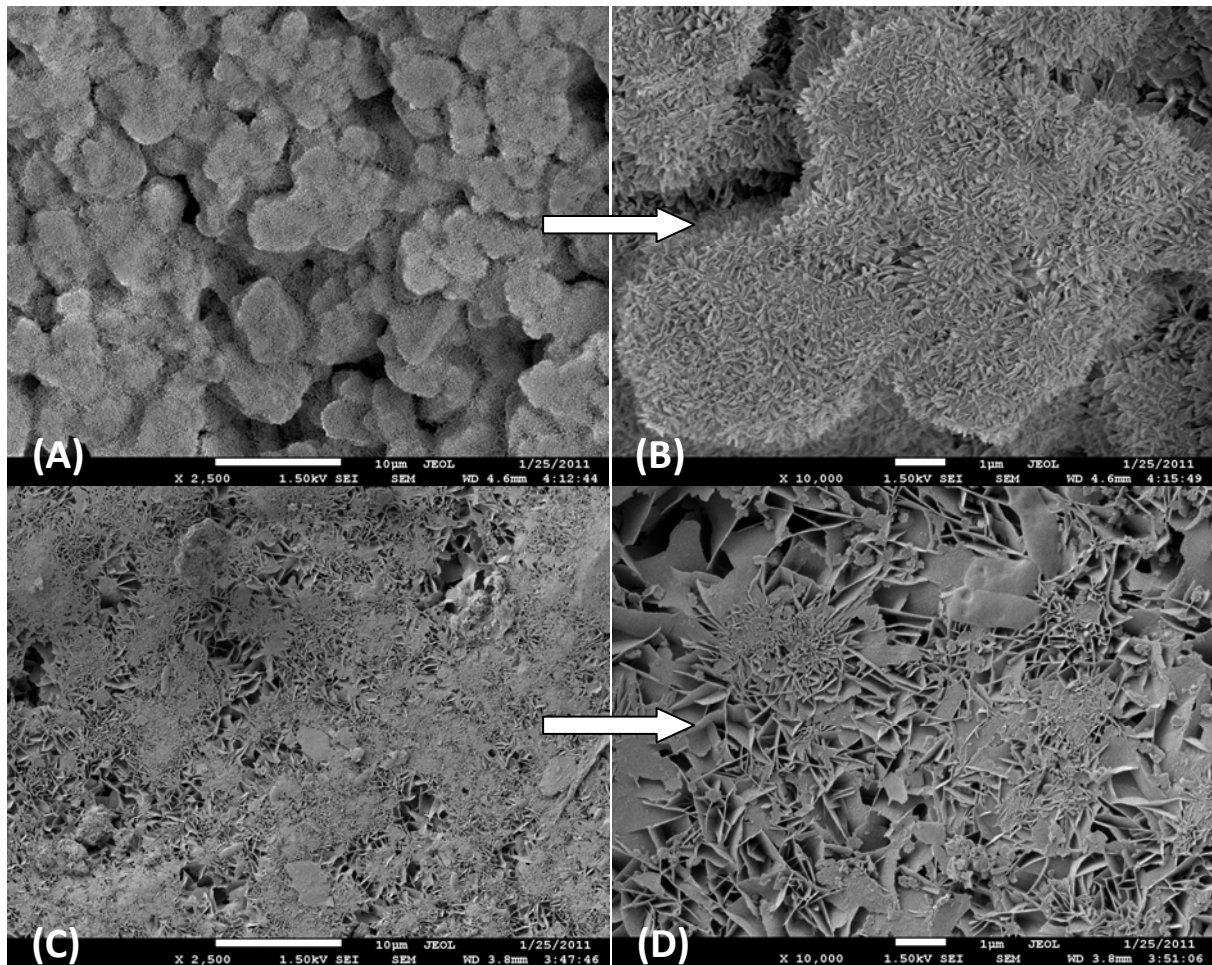


Figura 32: Micrografías de FESEM mostrando superficies de poros en espumas a dos aumentos diferentes: (A) E X2500 (B) E X10000 (C) AE X 2500 (D) AE X10000

Del estudio de microscopía electrónica realizado, se deduce que la introducción de la DOXY-h altera las condiciones de cristalización de la HA, y del mismo modo, las interacciones entre el tensioactivo y el antibiótico también son una fuente de modificación de la cristalización. Ambos extremos pueden ser parámetros de relevancia a estudiar en mayor profundidad en el futuro.

4.6. Porosimetría

Se decidió estudiar las diferencias de porosimetría entre cementos densos D y DT con cementos espumados E, así como sus homólogos con DOXY-h (AD, ADT y AE) mediante porosimetría de intrusión de mercurio.

En la figura 33 se observa la distribución de tamaños de poro de un cemento denso con tensioactivo (DT). Se observa un gran pico centrado en 0,03 que representa la porosidad introducida por las agujas y las placas (Figura 29). Se observan 2 otros picos, siendo centrados en 0,2 y 0,6 que pueden atribuirse a la porosidad creada por el espacio entre



aglomerados de agujas y placas, que es un factor relacionado con la RLP. Cuanto más aumenta la RLP, mayor cantidad de fase líquida disponible y por tanto espacio entre los diferentes aglomerados [57].

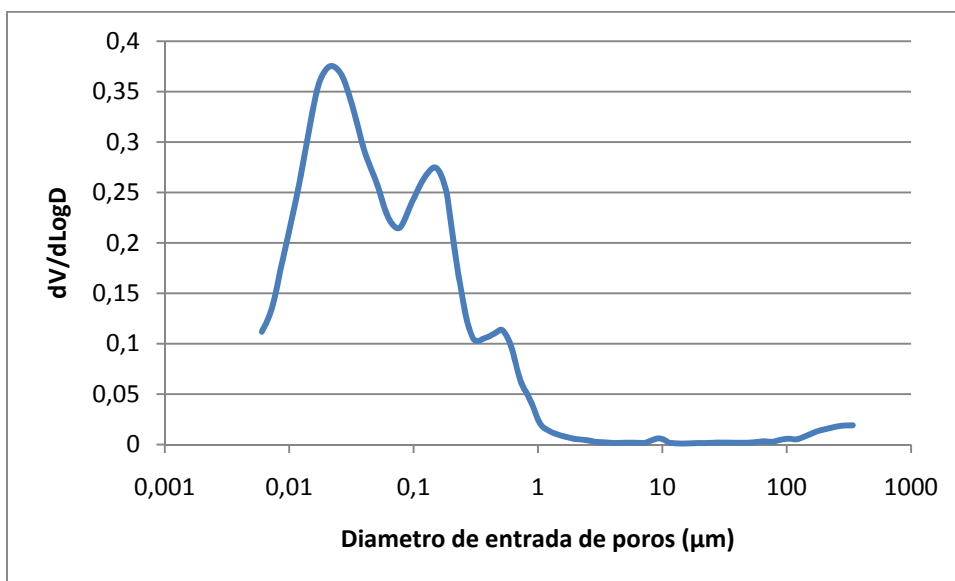


Figura 33: Distribución de tamaños de poro para cementos densos con presencia de Tween (DT)

En la figura 34 se presenta la distribución de tamaños de poro para un cemento espumado tipo E. Se observa un perfil claramente diferente del cemento denso con tensioactivo previamente, que presenta dos picos separados: Uno es más grande y estrecho, centrado a un diámetro de poro de 100μm y posiblemente representa la macroporosidad añadida manualmente.

El otro, más pequeño, está centrado en 0,1μm y representa la microporosidad introducida por las agujas y las placas presentes en la microestructura del cemento (Figura 31 b). Al tratarse de un pico más ancho, indica que existe una amplia distribución de poros alrededor de 0,1μm de tamaño [57].



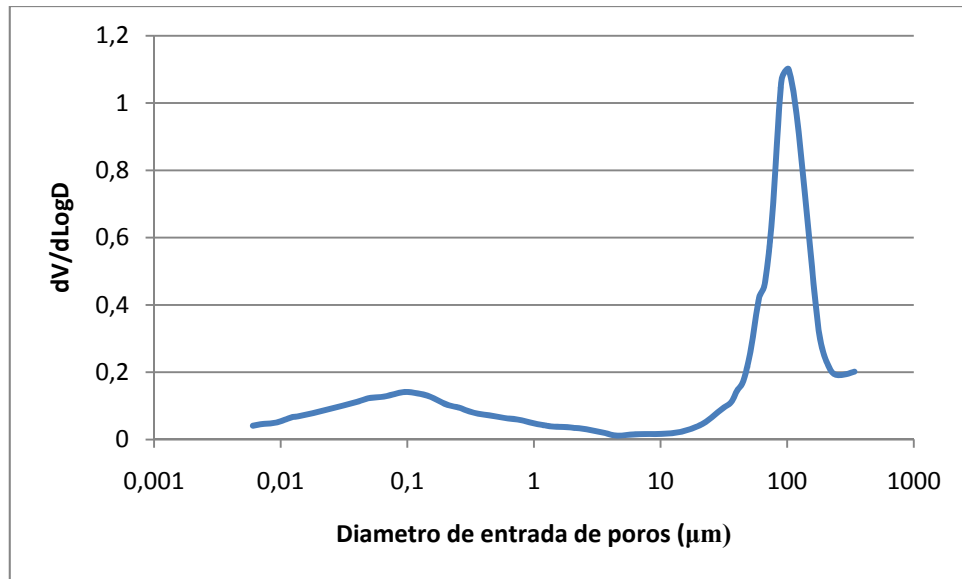


Figura 34 : Distribución de tamaños de poro para cementos espumados E

En la figura 35, extraída de [57], se representan los dos tipos de porosidad encontrados en los cementos sólidos. Como se ha mencionado, el pico adicional que aparece en los cementos espumados alrededor de 100μm es debido a los macroporos introducidos por espumado que pueden verse en figura 30a).

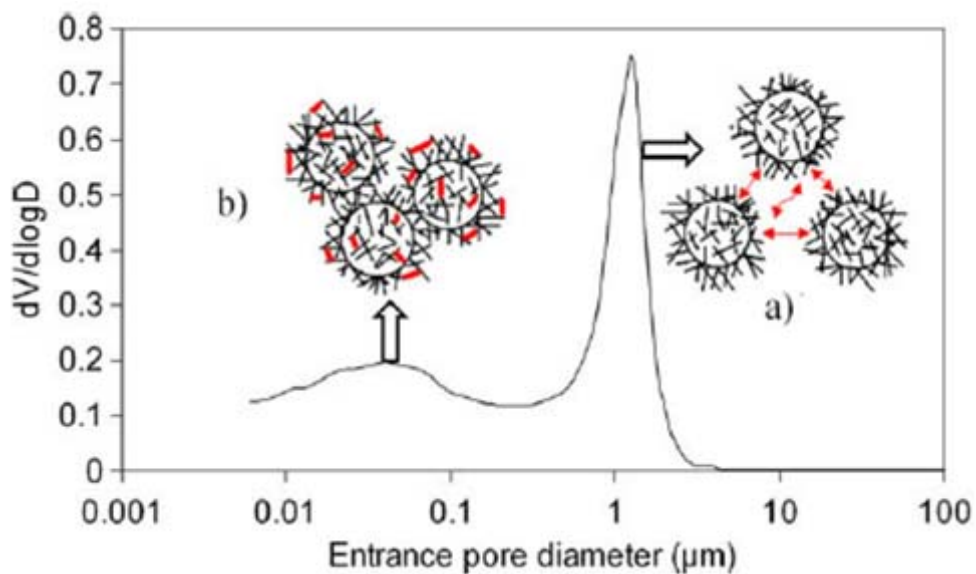


Figura 35: Dibujo de los diferentes tipos de porosidad existentes in CPCs relacionados con los diferentes tipos de picos en las curvas MIP: (a) porosidad entre agregados; (b) porosidad entre cristales precipitados. Extraído de [57].

Debido a un problema técnico con el equipo, no se han podido obtener resultados del MIP para los otros cementos.



4.7. Ensayos de liberación

Dado que se implementó por primera vez el test de disolución en el laboratorio del Grupo BIBITE el primer ensayo se realizó para optimizar los parámetros de funcionamiento del equipo.

4.7.1. Ensayo de optimización

El ensayo de liberación se preparó a la llegada de los moldes individuales para los cementos y las espumas. Se prepararon cementos de diferentes tipos:

- 2 cementos AD
- 2 cementos ADT
- 3 cementos AE
- 1 cemento D

Se utilizaron los moldes individuales de 4*8mm en los vasos de color ámbar y se trabajó a velocidad de 100rpm y 37°C.

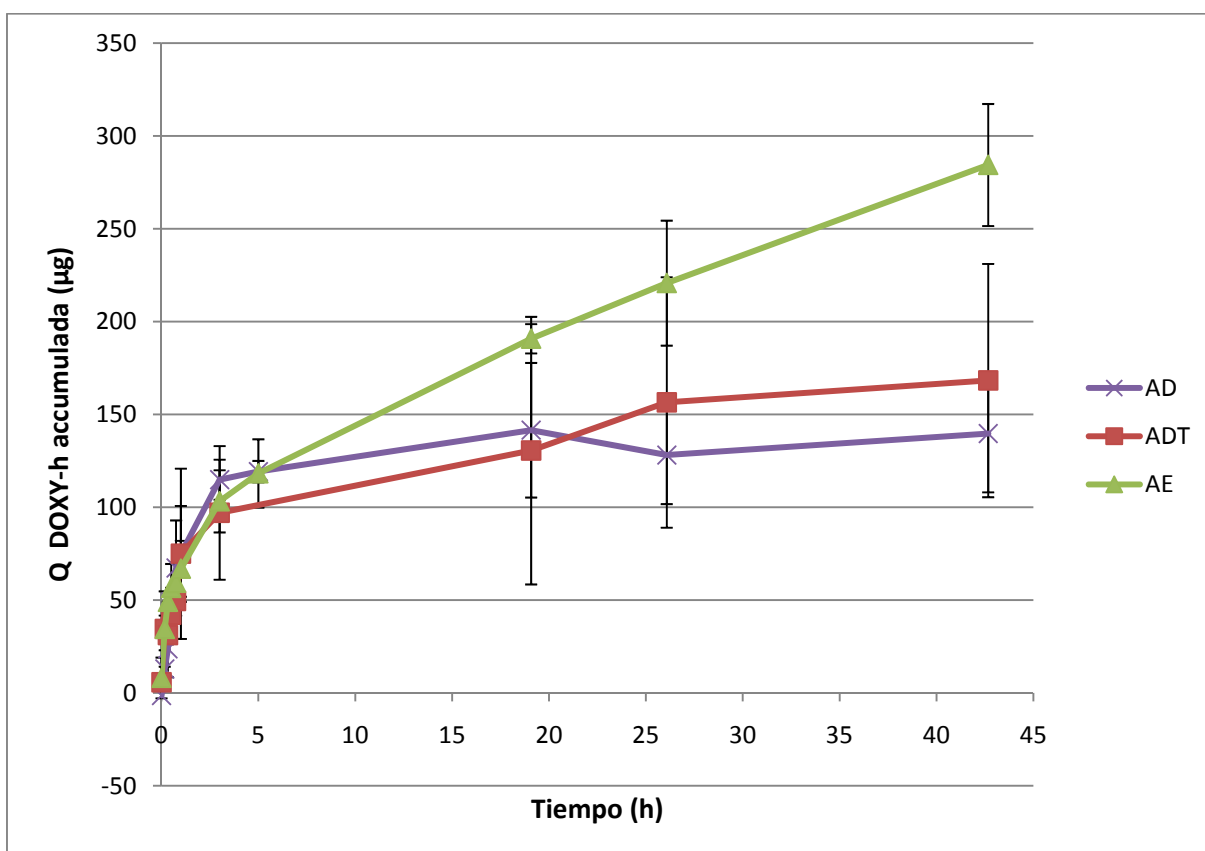


Figura 36 : Cantidad de DOXY-h liberada en µg según el tipo de cemento, a 37°C y con una agitación de 100rpm



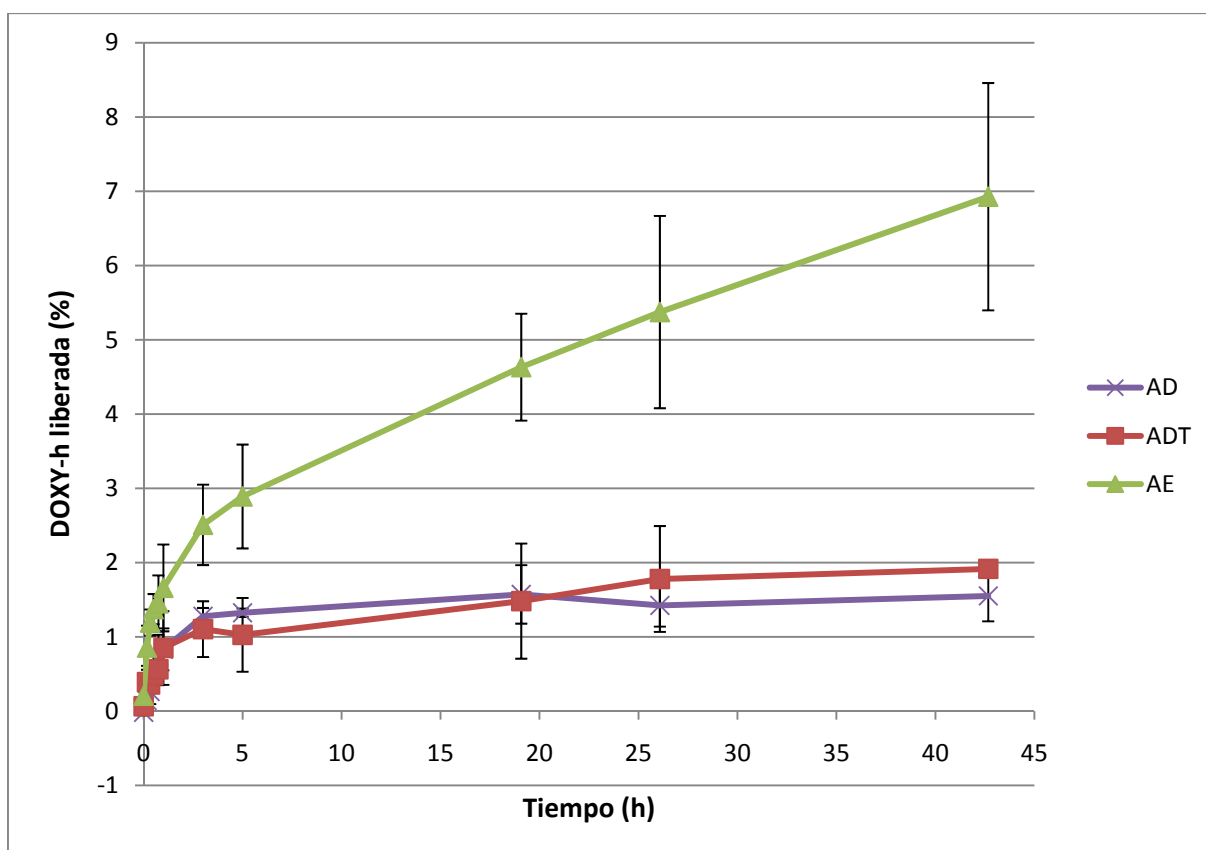


Figura 37: % de DOXY-h liberada según el tipo de cemento, a 37°C y con una agitación de 100rpm

En la figura 36 se observa que todas las muestras de CPC conteniendo antibiótico liberan una cantidad determinada del mismo. Se observa que los cementos densos utilizados han liberado menor cantidad de antibiótico que sus homólogos estudiados en ensayos realizados en otros trabajos del grupo (con otro tipo de equipo para estudiar la liberación) se pueden explicar por el hecho de que solo hay una superficie en contacto con el PBS debido a los nuevos moldes utilizados y posiblemente también debido a una agitación demasiado baja

Sin embargo se pueden destacar interesantes tendencias de liberación.

- Los cementos espumados AE, aunque tienen un peso en antibiótico aproximadamente 2 veces inferior a los densos (se pesaron los moldes para conocer el peso exacto de cada cemento), liberan una cantidad en antibiótico mayor, como se puede ver en la figura 36. Ello equivale a un porcentaje de liberación muy superior a los densos (Figura 37).
- Los cementos densos son o con tensioactivo AD y ADT muestran un perfil y porcentaje de liberación bastante similar.
- El cemento D, que no tiene antibiótico no presenta liberación.



- En este primero ensayo se constató la necesidad de medir las muestras el mismo día en que se extraen del baño para evitar su degradación.

Se decidió aumentar la velocidad de agitación hasta 150rpm para facilitar la difusión. Se observó que los moldes son adecuados en el sentido que hundieron y no se movieron a causa de la agitación y manteniendo la zona de contacto del CPC con el medio receptor durante la totalidad del ensayo.

4.7.2. Influencia de los componentes y del espumado sobre la liberación

En las figuras 38 y 39 se representan los perfiles de liberación en cantidad acumulada de DOXY-h y en porcentaje de liberación de principio activo, respectivamente, en función del tiempo en contacto con la solución receptora de PBS. Los resultados son el promedio de cuatro replicados. Se puede observar que en algunas curvas se detiene la liberación a las 72h, puesto que no se pudo tomar la última muestra por causas ajenas a nuestra voluntad. Por ello se comparan los valores después de 72 horas.

En términos de cantidad liberada en peso, se observa una liberación diferente para cada tipo de cemento. Después de 72h, el tipo de cemento espumado AE ha liberado mayor cantidad (395µg), seguido por el cemento denso ADT con 308µg y finalmente el tipo denso AD que solo liberó 180µg. Los cementos AE liberan un poco más, aunque sus pesos iniciales son casi dos veces inferiores a los de los cementos densos. Esto hace que el porcentaje de liberación sea muy superior en el caso de espumas (con 9,3% de DOXY-h cedida al medio, frente al 3,5% para el ADT y al 2,2% para el AD).

Al analizar el error asociado a cada tipo de muestra, se puede observar que las desviaciones estándar indican que en los casos de AE las diferencias entre muestras son mucho más grandes. Ello puede atribuirse a la variabilidad inherente al proceso de espumado que disminuye la reproductibilidad.



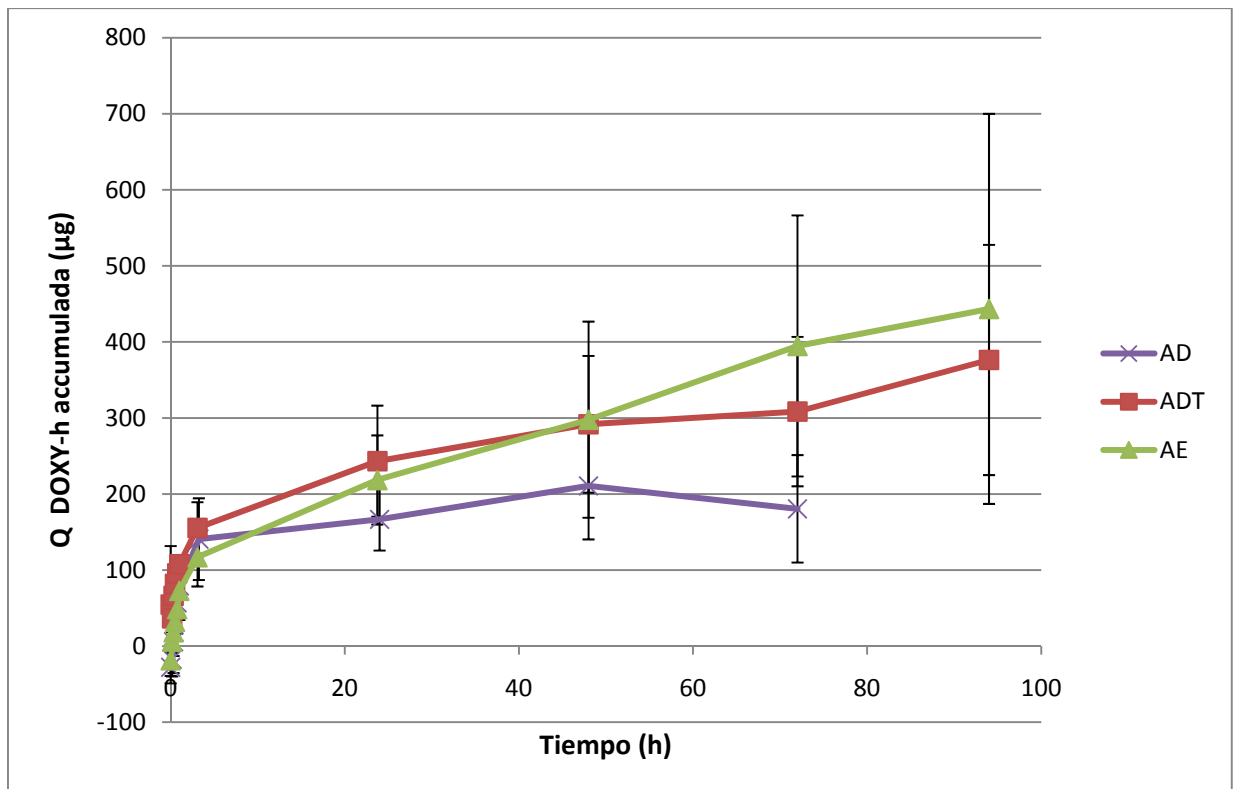


Figura 38: Cantidad de DOXY-h liberada en µg según el tipo de cemento, a 37°C y con una agitación de 150rpm

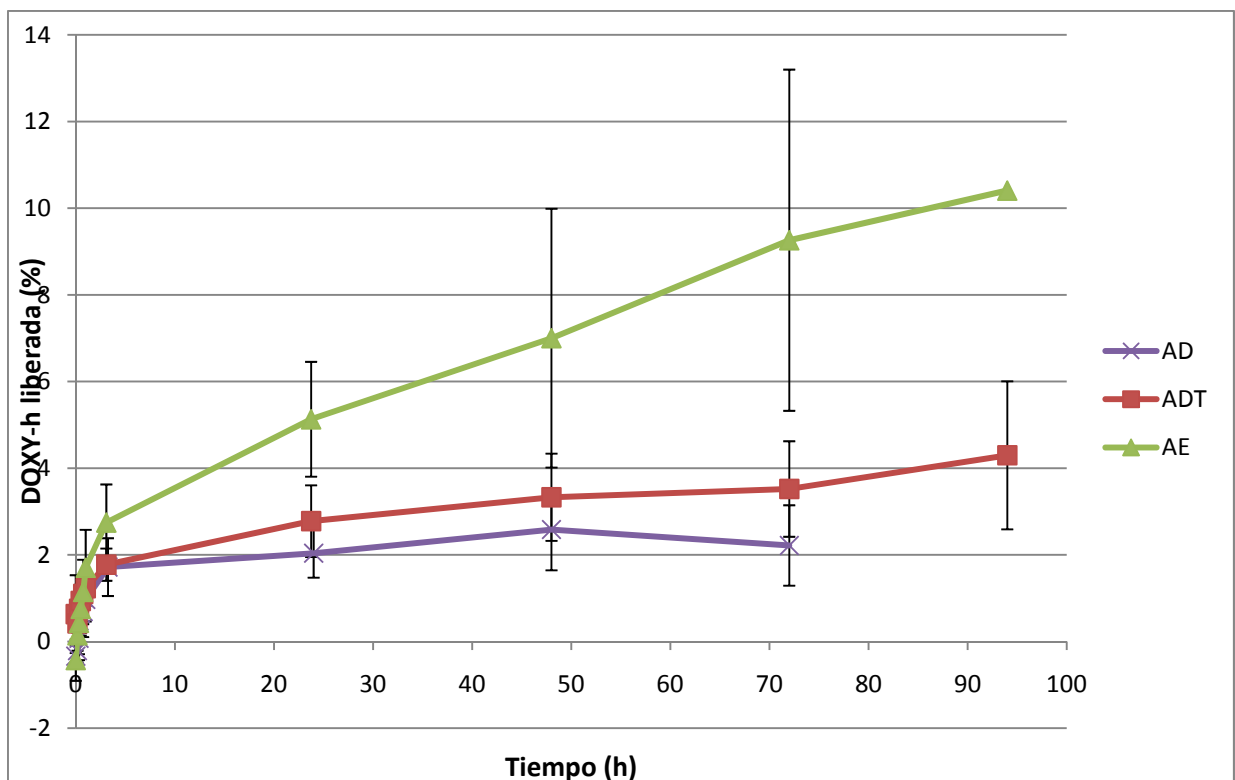


Figura 39: % de DOXY-h liberada según el tipo de cemento, a 37°C y con una agitación de 150rpm



4.7.3. Influencia de la cantidad de antibiótico en cementos espumados sobre la liberación

Se decidió de comprobar el efecto de una concentración de antibiótico diferente en cementos espumados. Por eso se prepararon cementos espumados con 100mg/mL de DOXY-h (AE100). Para más claridad se denominará AE50 los cementos AE. Cabe destacar un aumento de las dificultades a preparar los cementos AE100 debido a la velocidad elevada de fraguado ya desarrolladas en detalle en la parte de optimización (4.2.).

La cantidad de antibiótico liberada para los AE100 es 3 veces superior a las liberadas por los AE50 después de 72h de ensayo. Se hubiera podido pensar que el porcentaje de DOXY-h liberada sería bastante similar para los AE50 y los AE100, ya que tienen un peso comparable y un aspecto bastante similar. Sin embargo, los AE100 liberan un porcentaje total más elevado, pasando de 9,3 a 12,8%, como se puede ver en la figura 41.

Se observa de nuevo el fenómeno de una desviación estándar elevada para espumas. Se destaca en la figura 40 que para las espumas AE100, la derivación estándar para el peso de DOXY-h liberada es aún mayor. Ello puede ser debido a las dificultades al prepararlos, que resultaron en cementos de pesos diferentes, que, al relacionarlo con la porosidad significa porosidades diferentes. Además, las superficies de estos cementos AE100 igualmente fueron alteradas por este problema.

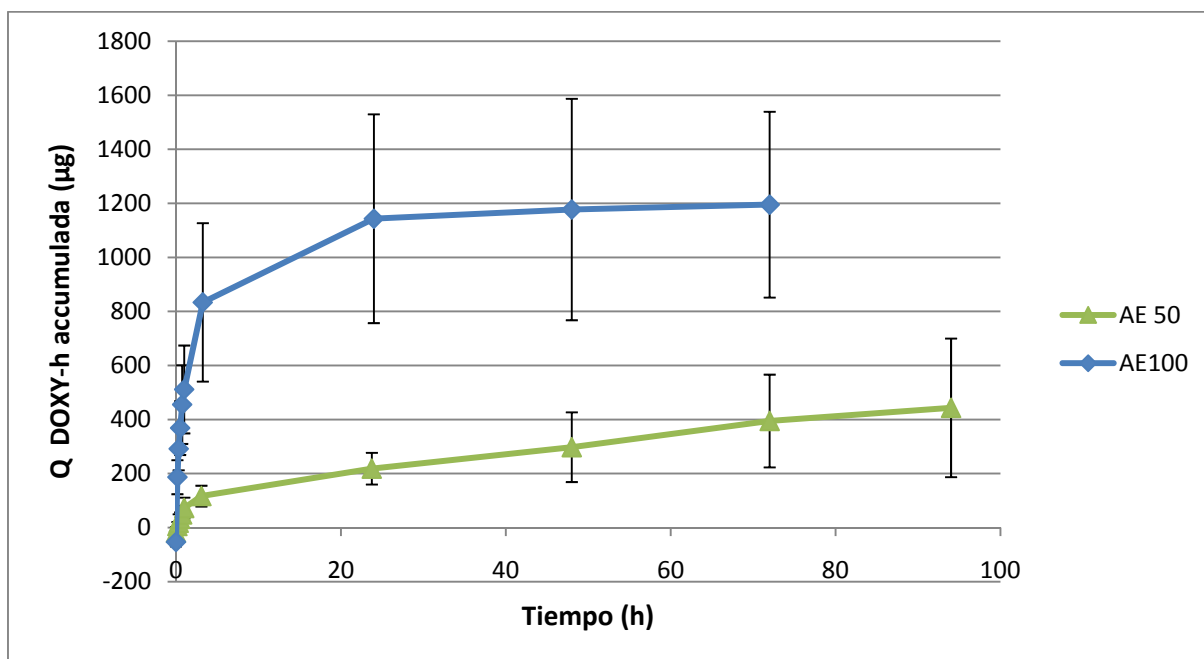


Figura 40: Cantidad de DOXY-h liberada en µg según la cantidad de antibiótico con la cual se prepararon cementos espumados, a 37°C y con una agitación de 150rpm



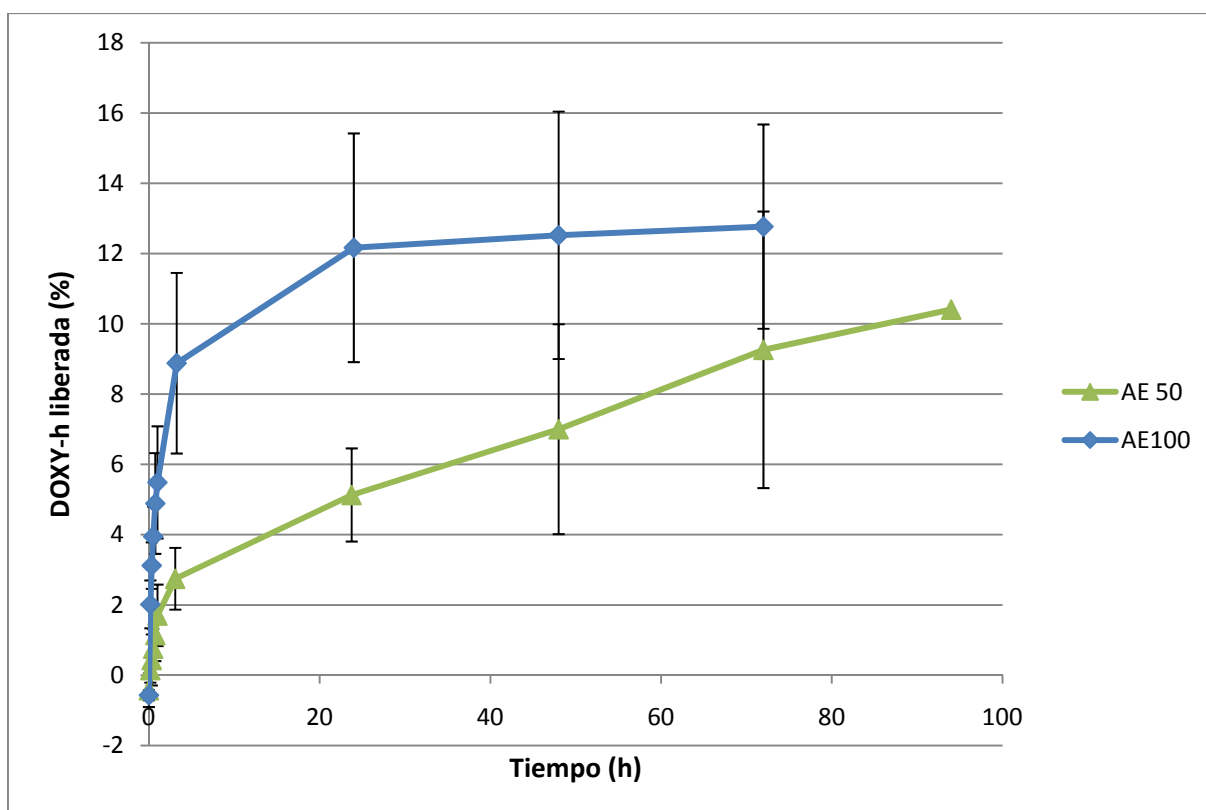


Figura 41: % de DOXY-h liberada según la cantidad de antibiótico con la cual se prepararon cementos espumados, a 37°C y con una agitación de 150rpm

Tipo muestra	Cantidad inicial DOXY-h (µg)	Cantidad liberada DOXY-h (µg) a 72h	% liberado a 72h	Velocidad de liberación (h ⁻¹) de 24h a 72h
AD	8242	180	2,2	0,0037
ADT	8752	308	3,5	0,0158
AE50	4254	395	9,3	0,0856
AE100	9293	1195	12,8	0,0125

Tabla 4: Resultados de los diferentes ensayos

En la tabla 4 se confirma el contenido en peso de antibiótico inferior en los cementos espumados respecto a los densos con la misma composición. En la tabla se incluye la velocidad de liberación (pendiente de la recta de ajuste entre 24 y 72h), que da una indicación de si el proceso de liberación de los materiales objeto de estudio puede continuar (pendiente positiva) o está llegando al estadio estacionario (pendientes próximas a 0). Ello permite apuntar que los cementos espumados AE50 aun tienen capacidad para liberar más principio activo sobre un tiempo más grande, mientras que los cementos AD parecen estar próximos al estado estacionario. Estas diferencias pueden atribuirse probablemente a las diferencias de estructura introducidas por los macroporos de las espumas.



5. Impacto ambiental y costes del proyecto

5.1. Costes

Se pueden separar los costes de este proyecto en dos partes, o sea los costos de materiales y reactivos utilizados (Tabla 5) y los costos debidos a las técnicas utilizadas (Tabla 6).

Producto	Cantidad (g o unidades)	Precio(€)
Fosfato dicálcico CaHPO_4	786	50,30
Carbonato de calcio CaCO_3	290	90,94
Hiclato de Doxiciclina	4	34,08
Bote estéril	50	8
Pipeta pasteur de plástico	30	0,6
Guantes de vinilo	400	16
Total	-	199,92

Tabla 5 : Costes de los reactivos necesarios para la preparación de los materiales y del material de laboratorio empleados a lo largo del proyecto

Técnica	Precio por hora o ensayo (€)	Precio total (€)
FESEM	37,5	75
BET	64,5	387
DRX	7	7
Espectrofotómetro	8	144
MIP	145	870
Horno	8	360
Total	-	1843

Tabla 6 : Costes de las técnicas de caracterización empleadas a lo largo del proyecto

Entonces el costo total para la realización de este proyecto es aproximadamente de 2043€.

5.2. Impacto ambiental

El proyecto se hizo con una atención importante al no dañar el medio ambiente. El fosfato de calcio que es el material que se utilizó en mayoría es el componente principal de los tejidos duros del cuerpo humano, por lo que no implica un peligro por la naturaleza, ya que es natural.

Además en el laboratorio del grupo BIBITE se separan los residuos de manera estricta. Se ponen los residuos de cementos en una basura específica para que sean tratados de



manera diferente que los residuos normales, y se ponen fluidos orgánicos, ácidos, básicos y corrosivos en contenedores apropiados.

Se puede considerar que la única técnica la más peligrosa por el entorno que se utilizó es la porosimetría de mercurio, ya que el mercurio es un metal pesado que no es biodegradable. Sin embargo solo se estudiaron 6 muestras y condiciones de seguridad del entorno se respetan durante este tipo de ensayo. Por lo tanto se puede considerar que el impacto ambiental del proyecto es bastante bajo.



6. Conclusiones

En el presente trabajo se ha evaluado la influencia de la macroporosidad en los CPCs como vehículos de principios activos antibióticos. En concreto se han estudiado formulaciones de cementos de hidroxiapatita espumados y sin espumar en presencia y ausencia del antibiótico Hiclato de doxiciclina.

Se han optimizado las condiciones de formación de espumas conteniendo el antibiótico, atendiendo a parámetros como tiempo de fraguado, porosidad interna y superficial de las espumas o posibilidad de desmolde de las mismas. Se ha diseñado un dispositivo específico adecuado que permite la realización de ensayos de liberación de principios activos con cementos espumados. La formulación seleccionada tras la etapa de optimización consiste en una fase solida de polvo α -TCP coarse conteniendo un 2% de PHA y 50mg/mL de DOXY-h y una fase liquida con H_2O_{mQ} conteniendo 1% de Tween 80 en peso, utilizando una RLP de 0,55.

Se estudiaron cementos espumados y densos, con o sin antibiótico añadido, y se ha intentado relacionar su micro y macroestructura con sus propiedades de liberación de DOXY-h.

La superficie específica (SSA) de cementos sin DOXY-h es muy inferior a la de cementos que lo contienen, y se observan más agujas en estos últimos sobre las micrografías FESEM. Ello lleva a pensar que la DOXY-h juega un papel en los procesos de disolución-precipitación que llevan a la formación del cemento, favoreciendo la nucleación frente al crecimiento cristalino. También se observó en el cemento denso conteniendo DOXY-h una ausencia casi total de cristalización. Por eso se cree que el Tween puede interaccionar con la DOXY-h y jugar un papel que impide o dificulta la cristalización, pero sus mecanismos aun no son claros, puesto que se observa que en las espumas con DOXY-h, en que el tensioactivo está organizado en forma de monocapa en la interfase aire-agua de las burbujas, la zona de la fase continua de la espuma (zona de fractura de los cementos) presenta una estructura cristalina bien organizada como en los cementos densos. A destacar también que en el caso de espumas con DOXY-h la microestructura del interior de un poro es muy diferente de la de la zona de fractura.

Los ensayos de disolución llevados a cabo para evaluar la posible cesión de antibiótico al medio muestran la influencia de la macroporosidad de los cementos sobre la liberación de principio activo, ya que los cementos espumados liberan más que los densos en cantidad, y de una manera significativamente superior en términos de porcentaje.



Como se podía prever, la cantidad de DOXY-h liberada por las espumas aumenta al utilizar CPCs espumados con mayor cantidad inicial de antibiótico, pero también se observó un porcentaje de liberación superior con este aumento. La presencia de Tween 80 en cementos densos parece incrementar ligeramente la liberación en los mismos, lo que quizás podría atribuirse al cambio de microestructura observado con el FESEM.



7. Trabajos futuros

En el futuro se pueden destacar algunos puntos de estudio particulares:

- Estudiar el efecto de otras relaciones líquido/polvo para las espumas de CPC, y también utilizar el polvo Fine
- Intentar aumentar la concentración de DOXY-h en los cementos espumados
- Estudiar en profundidad la reacción que ocurre entre la DOXY-h y el Tween80
- Optimizar el proceso de formación de cementos espumados conteniendo DOXY-h para que se pueda aplicar diferentes relaciones líquido/polvo y concentraciones de antibiótico.



Agradecimientos

Primero quisiera agradecer Maria Pau Ginebra que me ofreció la posibilidad de realizar mi practica en el laboratorio “Biomaterials, Biomechanics and Tissue Engineering”.

Luego quería agradecer Cristina Canal para haber guiado el desarrollo del proyecto, así que para haber contestado a mis preguntas y explicado las grandes líneas del proyecto. Cristina, para tu disponibilidad y tus consejos, merci !

Gracias también a Maite Valderas que me ayudó mucho para entender cómo preparar los cementos de fosfato de calcio y me explico el protocolo de formación de cementos espumados.

Finalmente agradezco toda la gente trabajando en el laboratorio para su disponibilidad así que su buen humor, que hizo mi estancia muy agradable.



Bibliografía

- [1] E. L. Hedberg and A. G. Mikos, "Bone Augmentation and Repair," *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, 2008, pp. 782-787.
- [2] T. Nakano, Y. Tabata, and Y. Umakoshi, "Texture and Bone reinforcement," *Encyclopedia of Materials, Science and Technology Updates*, Elsevier, Oxford, 2005, p. 1–8.
- [3] A.S. Mistry and A.G. Mikos, "Tissue engineering strategies for bone regeneration," *Regenerative Medicine II*, 2005, p. 1–22.
- [4] E.B. Montufar Jiménez, "Espumas inyectables de hidroxiapatita obtenidas por el método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato tricálcico alfa," 2010.
- [5] M.P. Ginebra, "Clases de Biomateriales," *UPC*, 2010.
- [6] J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan, and E. Corporation, *Principles of Bone Biology*, Academic Press, 2001.
- [7] L. Junquera and J. Carneiro, "Basic histology," 2003.
- [8] S.R. Levitt, P.H. Crayton, E.A. Monroe, and R.A. Condrate, "Forming method for apatite prostheses," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 3, 1969, p. 683–685.
- [9] J.J. Klawitter and S.F. Hulbert, "Application of porous ceramics for the attachment of load-bearing orthopaedic applications," vol. 2, 1971, p. 161–168.
- [10] M.P. Ginebra, *Calcium phosphate bone cements*, 2008.
- [11] S.V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphates," vol. 42, 2007, pp. 1061-1095.
- [12] J. Lacout, E. Mejdoubi, and M. Hamad, "Crystallization mechanisms of calcium orthophosphate cement for biological uses," vol. 7, 1996, pp. 371-374.



- [13] Y. Song, Z. Feng, and T. Wang, "In situ study on the curing process of calcium phosphate bone cement," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 18, 2007, p. 1185–1193.
- [14] F.C.M. Driessens, J. Planell, M. Boltong, I. Khairoun, and M. Ginebra, "Osteotransductive bone cements," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 212, 1998, p. 427–435.
- [15] S.V. Dorozhkin, "Calcium Orthophosphate Cements and Concretes," *Materials*, vol. 2, Mar. 2009, pp. 221-291.
- [16] I. Khairoun, M. Boltong, F. Driessens, and J. Planell, "Limited compliance of some apatitic calcium phosphate bone cements with clinical requirements," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 9, 1998, p. 667–671.
- [17] S.V. Dorozhkin, "Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine," *Materials*, vol. 2, Apr. 2009, pp. 399-498.
- [18] E. Fernández, M.P. Ginebra, and M.G. Boltong, "Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 32, 1996, pp. 367-374.
- [19] M. Ginebra, E. Fernandez, E. De Maeyer, R. Verbeeck, M. Boltong, J. Ginebra, F. Driessens, and J. Planell, "Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement," *Journal of dental research*, vol. 76, 1997, pp. 905-912.
- [20] M. Ginebra, E. Fernández, and F. Driessens, "The effect of Na₂HPO₄ addition on the setting reaction kinetics of an α -TCP cement. Bioceramics 11, 243-246," *Bioceramics*, vol. 11, 1998, pp. 243-246.
- [21] W.J.E.M. Habraken, J.G.C. Wolke, A.G. Mikos, and J.A. Jansen, "Porcine gelatin microsphere/calcium phosphate cement composites: An in vitro degradation study," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 91, 2009, p. 555–561.
- [22] E. Fernández, M. Ginebra, O. Bermúdez, M. Boltong, F.C.M. Driessens, and J. Planell, "Dimensional and thermal behaviour of calcium phosphate cements during setting compared to PMMA bone cements," *Journal of Materials Science Letters*, vol. 14, 1995, p. 4–5.



- [23] E. Charrière, S. Terrazzoni, C. Pittet, P. Mordasini, M. Dutoit, J. Lemaître, and P. Zysset, "Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements," *Biomaterials*, vol. 22, 2001, p. 2937–2945.
- [24] L.C. Chow and E.D. Eanes, "Calcium phosphate cements. In Octacalcium Phosphate," vol. 18, 2001, pp. 148-163.
- [25] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 26, 2005, p. 5474–5491.
- [26] T. Shyam, "Effect of scaffold architecture on diffusion of oxygen in tissue engineering constructs," 2007.
- [27] C. Rodríguez-Navarro and E. Sebastián, "Técnicas de análisis del sistema poroso de materiales pétreos ornamentales: usos y limitaciones," *Ing*, vol. 155, 1995, p. 130–142.
- [28] A.R. Studart, U.T. Gonzenbach, E. Tervoort, and L.J. Gauckler, "Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 89, Jun. 2006, pp. 1771-1789.
- [29] L. Draghi and A. Cigada, "Nanostructured surfaces for biomedical applications. Part I: nanotopography.," *Journal of applied biomaterials & biomechanics: JABB*, vol. 5, 2007, pp. 61-67.
- [30] K. Rezwan, Q. Chen, J. Blaker, and A.R. Boccaccini, "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, 2006, p. 3413–3431.
- [31] S. Yang, K.F. Leong, Z. Du, and C.K. Chua, "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors," *Tissue engineering*, vol. 7, 2001, p. 679–689.
- [32] D. Green, D. Walsh, S. Mann, and R. Oreffo, "The potential of biomimesis in bone tissue engineering: Lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons," *Bone*, vol. 30, 2002, p. 810–815.
- [33] Y. Hsu, I. Turner, and A. Miles, "Fabrication of porous bioceramics with porosity gradients similar to the bimodal structure of cortical and cancellous bone," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 18, 2007, p. 2251–2256.



- [34] B. Otsuki, M. Takemoto, S. Fujibayashi, and M. Neo, "Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive," *Biomaterials*, 2006.
- [35] M. Porter, *Handbook of surfactants*, Chapman & Hall, 1994.
- [36] Sigma, "Tween 80: Product information," 2008, p. 5188.
- [37] A. Hillgren, J. Lindgren, and M. Aldén, "Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH," *International journal of pharmaceutics*, vol. 237, 2002, p. 57–69.
- [38] M.J. Akers, "Excipient-drug interactions in parenteral formulations," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 99, 2002, p. 2283.
- [39] M. Ash and I. Ash, *Handbook of pharmaceutical additives*, Aldershot : Gower Publishing, 1995.
- [40] A.G. Floyd, "Top ten considerations in the development of parenteral emulsions," *Pharmaceutical Science & Technology Today*, vol. 2, 1999, p. 134–143.
- [41] National Osteoporosis Foundation, *Physician's guide to prevention and treatment of osteoporosis*, 1998.
- [42] M.P. Ginebra, T. Traykova, and J. a Planell, "Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review.," *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 113, Jun. 2006, pp. 102-10.
- [43] M.-P. Ginebra, T. Traykova, and J. a Planell, "Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system?," *Biomaterials*, vol. 27, Apr. 2006, pp. 2171-7.
- [44] D.G. Arkfeld and E. Rubenstein, "Quest for the holy grail to cure arthritis and osteoporosis: emphasis on bone drug delivery systems," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 57, 2005, p. 939–944.
- [45] A. Tiselius, S. Hjerten, and "O Levin, "Protein chromatography on calcium phosphate columns," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 65, 1956, p. 132–136.



- [46] S.V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphate cements for biomedical application," *Journal of Materials Science*, vol. 43, 2008, p. 3028–3057.
- [47] M. Bokor-Bratić and T. Brkanić, "Clinical use of tetracyclines in the treatment of periodontal diseases," *Medicinski pregled*, vol. 53, 2000, pp. 266-271.
- [48] P.A. Norowski and J.D. Bumgardner, "Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review.," *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, vol. 88, Feb. 2009, pp. 530-43.
- [49] N.S. Ramamurthy, B.R. Rifkin, R.A. Greenwald, J. Xu, Y. Liu, G. Turner, L.M. Golub, and A.T. Vernillo, "Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines," *Journal of periodontology*, vol. 73, 2002, p. 726–734.
- [50] K. Parfitt, Martindale, *The complete Drug reference*, Pharmaceutical Press, 1999.
- [51] B. Klinge, M. Hultin, and T. Berglundh, "Peri-implantitis," vol. 49, 2005, pp. 661-676.
- [52] P.A. Webb, "Volume and density determinations for particle technologists," *Micromeritics Instrument Corp., Norcross, Georgia, USA*, 2001, p. 1–16.
- [53] R. Cook, "Mercury porosimetry of hardened cement pastes," *Cement and Concrete Research*, vol. 29, Jun. 1999, pp. 933-943.
- [54] P.A. Webb, "An introduction to the physical characterization of materials by mercury intrusion porosimetry with emphasis on reduction and presentation of experimental data," *Micromeritics Instrument Corp., Norcross, Georgia*, vol. 22, 2001.
- [55] P.A. Webb, "An introduction to the physical characterization of materials by mercury intrusion porosimetry with emphasis on reduction and presentation of experimental data," *Micromeritics Instrument Corp., Norcross, Georgia*, vol. 22, 2001.
- [56] J. Chmiola, G. Yushin, R. Dash, and Y. Gogotsi, "Effect of pore size and surface area of carbide derived carbons on specific capacitance," *Journal of Power Sources*, vol. 158, Jul. 2006, pp. 765-772.
- [57] M. Espanol et al., "Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications," *Acta biomaterialia*, vol. 5, 2009, pp. 2752-62.

